

COMPUESTOS ORGANOSULFURADOS COMO BIOESTIMULANTES VEGETALES

CAMPO DE LA INVENCION

La divulgación se refiere a composiciones que contienen organoazufre, en particular
5 tiosulfonato de di-n-propilo (PTSO) y tiosulfinato de di-n-propilo (PTS), tiosulfonato de di-
metilo, tiosulfonato de di-fenilo y disulfuro de di-n-propilo. Estas composiciones son útiles
como bioestimulantes para plantas. En particular, estas composiciones pueden dar por
resultado eficiencia incrementada al uso de nutrientes, tolerancia incrementada al estrés
abiótico y/o características mejoradas de calidad. Las composiciones que comprenden estos
10 compuestos organosulfurados también se proporcionan para uso agrícola.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las plantas se cultivan, idealmente, bajo condiciones óptimas a fin de obtener las
características deseadas, tal como alto rendimiento o alta calidad.

Las condiciones de crecimiento se pueden optimizar en términos de sustrato de raíz,
15 fertilización, riego, drenaje, suministro de luz, temperatura, movimiento de aire, humedad de
aire y control de plagas. Durante la producción de cultivos y plantas en horticultura, la mayoría
de las condiciones de crecimiento mencionadas se mantienen bajo estricto control. Sin
embargo, hay situaciones donde los sistemas de control no son capaces de mantener los
parámetros óptimos bajo control preciso, por ejemplo, cambios repentinos en las condiciones
20 climáticas. Los ejemplos son la alternancia de períodos soleados y nublados que dan por
resultado períodos cortos de luz y altas temperaturas o viceversa; cambios repentinos de
temperatura, tal como noches frías que van conjuntamente con calentamiento incrementado
y baja humedad y dan por resultado altas tasas de evaporación por las plantas; largos
períodos de clima nublado que dan por resultado una baja tasa de fotosíntesis y alta humedad;
25 largos períodos de sol que dan por resultado un exceso de calor y baja humedad y alta
evaporación por las plantas.

Incluso durante períodos de crecimiento favorables, las condiciones de crecimiento

pueden presentarse de tal manera que la planta no es capaz de captar suficiente agua y nutrientes y crece menos rápidamente en comparación con la situación de que los nutrientes y agua están presentes en exceso.

Los nutrientes vegetales son elementos químicos y compuestos necesarios para crecimiento vegetal y/o el metabolismo vegetal. Por ejemplo, para el crecimiento y desarrollo de plantas vasculares, se necesitan los siguientes elementos, específicamente, carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), azufre (S), calcio (Ca), magnesio (Mg), boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni) y zinc (Zn). Varias plantas vasculares también necesitan silicio (Si).

En la agricultura, el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), azufre (S), calcio (Ca), magnesio (Mg), boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), zinc (Zn) y silicio (Si) se proporcionan en general en los fertilizantes. Estos elementos se pueden suministrar como sales relativamente puras o como material orgánico complejo, por ejemplo, compost, residuos vegetales, estiércol animal (parcialmente) descompuesto de vacas, pollos, cerdos, etc. y usualmente se complementan en exceso, a fin de prevenir limitaciones de nutrientes.

Está claro que durante la agricultura en los campos abiertos las plantas se cultivan bajo condiciones más variables que en los invernaderos. No solo la temperatura, luz solar y sustrato de raíz/humedad de aire son factores abióticos importantes, sino también el viento, heladas, salinidad, inundaciones y sequía. Las condiciones descritas dan por resultado estrés abiótico para los cultivos y dan por resultado menores rendimientos y/o peores parámetros de calidad de los cultivos. El estrés abiótico se define como el impacto negativo de factores no vivos en los organismos vivos en un ambiente específico. Está claro que algunos cultivos y plantas ornamentales, incluso bajo condiciones controladas de invernadero, tienen una menor tolerancia al estrés abiótico. Esto depende en gran medida de la especie, subespecie híbrida, variante o cultivar.

En los últimos años, el uso de bioestimulantes vegetales ha surgido como un medio para mejorar las características de plantas. De acuerdo con Du Jardin, P (2012) "The science of plant biotimulants-a bibliographic analysis. Ad hoc Study Report to the European Commission DG ENTR; 2012", un bioestimulante vegetal es cualquier sustancia o

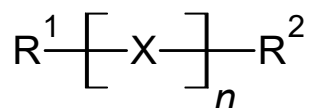
microorganismo aplicado a las plantas con el objetivo de mejorar la eficiencia nutricional, tolerancia al estrés abiótico y/o rasgos de calidad de cultivos, independientemente de su contenido de nutrientes. Los bioestimulantes tienen la capacidad de modificar los procesos fisiológicos de las plantas de una manera que proporciona beneficios potenciales al crecimiento, desarrollo y/o respuesta al estrés.

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar bioestimulantes vegetales adecuados para uso en agricultura.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La divulgación proporciona las siguientes modalidades preferidas.

1. El uso de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, o una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, como un biostimulante para una planta; en donde la Fórmula I es:



Fórmula I,

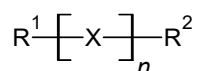
- en donde n es 2;

en donde una X es -S- y la otra X se selecciona del grupo que consiste en -S-, -S(O)- y -S(O)₂-;

- y R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido y heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, preferentemente en donde el compuesto de acuerdo con la fórmula

I es tiosulfonato de di-n-propilo (PTSO), disulfuro de di-n-propilo, tiosulfonato de dimetilo o tiosulfonato de di-fenilo.

2. Un método, caracterizado porque comprende proporciona a una planta un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, o una composición que comprende un compuesto de
5 acuerdo con la Fórmula I:



Fórmula I,

en donde n es 2;

10 en donde una X es -S- y la otra X se selecciona del grupo que consiste en -S-, -S(O)- y -S(O)₂-;

y R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo
15 opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido y heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, preferentemente en donde el compuesto de acuerdo con la fórmula I es tiosulfonato de di-n-propilo (PTSO), disulfuro de di-n-propilo, tiosulfonato de dimetilo o tiosulfonato de di-fenilo. Preferentemente, el método es para incrementar la tasa de crecimiento, desarrollo, rendimiento y/o cosecha de una planta. El método también puede incrementar el vigor de una planta. Preferentemente, el método es para incrementar la
20 eficiencia de uso de nutrientes, incrementar la tolerancia de una planta al estrés abiótico, mejorar las características de calidad de una planta y/o incrementar la disponibilidad de nutrientes retenidos en el suelo o en la rizosfera para una planta

3. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo
25 opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido.

4. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de alquilo de C_{1-6} y fenilo; en donde el grupo fenilo se sustituye opcionalmente con alquilo de C_{1-3} o alcoxi de C_{1-3} ;

5 en donde preferentemente R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de metilo, etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, fenilo, *p*-tolilo y 4-metoxifenilo.

5. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde R^1 y R^2 son idénticos.

10 6. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 4, en donde el compuesto de acuerdo con la fórmula I se selecciona del grupo que consiste en tiosulfonato de di-*n*-propilo (PTSO), metanotiosulfonato de S-metilo, tiosulfonato de S-fenilbenceno, tiosulfinato de di-*n*-propilo (PTS), tiosulfinato de metil metano, tiosulfinato de butil butano, tiosulfinato de metil propeno, disulfuro de di-*n*-propilo, disulfuro de dimetilo, disulfuro de dietilo, disulfuro de di-*n*-butilo, disulfuro de difenilo, disulfuro de di-*p*-tolilo y disulfuro de bis(4-metoxifenilo);

15 en donde preferentemente el compuesto de acuerdo con la fórmula I es tiosulfonato de di-*n*-propilo (PTSO) o tiosulfinato de di-*n*-propilo (PTS).

20 7. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde al menos 60 % en peso, preferentemente al menos 80 % en peso, más preferentemente al menos 95 % en peso, de compuestos organosulfurados en esta composición se seleccionan de compuestos de acuerdo con la Fórmula I.

8. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde cuando la composición comprende tiosulfinato de dialilo, la relación del compuesto o compuestos de acuerdo con la fórmula I a tiosulfinato de dialilo en peso es mayor que 0,1 preferentemente mayor que 1 y

25 en donde cuando la composición comprende disulfuro de dialilo, la relación del compuesto o compuestos de acuerdo con la fórmula I a disulfuro de dialilo en peso es mayor

que 0,1, preferentemente mayor que 1.

9. El uso de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el uso como bioestimulante mejora uno o más de lo siguiente:

5 a) eficiencia de uso de nutrientes, b) tolerancia al estrés abiótico, c) características de calidad y d) disponibilidad de nutrientes confinados retenidos en el suelo o en la rizosfera.

10. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición está esencialmente libre de tiosulfato de dialilo.

10 11. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición está esencialmente libre de disulfuro de dialilo.

12. El uso, método o composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende al menos 0,5 mg/L de un compuesto de acuerdo con la fórmula I.

15 13. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la planta pertenece al clado *Embryophyta* o al clado *Angiospermae*.

14. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste en *Phalaenopsis*, *Chrysanthemum*, *Solanum lycopersicum* y *Lactuca sativa*.

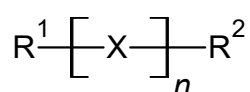
20 15. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende además un fertilizante, un pesticida, un agente humectante, un compuesto antimicrobiano, desinfectante, compuesto quelante, compuesto aromático y/o un bioestimulante adicional.

16. El uso o método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en

donde el compuesto o composición se aplica directamente a la planta, a la semilla de la planta o al suelo de la planta o semilla.

17.El uso o método de la modalidad 16, en donde el compuesto o composición se aplica mediante riego por goteo.

- 5 18.Un método que comprende proporcionar a una planta, preferentemente mediante riego, una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I:



Fórmula I,

en donde n es 2;

- 10 en donde una X es -S- y la otra X se selecciona del grupo que consiste en -S-, -S(O)- y -S(O)₂-;

- y R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo
15 opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido y heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, preferentemente en donde el compuesto de acuerdo con la fórmula I es tiosulfonato de di-n-propilo (PTSO), disulfuro de di-n-propilo, tiosulfonato de dimetilo o tiosulfonato de di-fenilo,

- en donde la composición se proporciona a la planta al menos seis veces durante el
20 ciclo de cultivo de la planta y/o la composición se proporciona a la planta cada 4-21 días durante el ciclo de cultivo de la planta.

19.El uso, método o composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende un emulsionante.

20.El uso, método o composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende un bioestimulante basado en aminoácidos.

21.El uso, método o composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende aminoácidos y péptidos libres.

5 22.El uso del método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-19, en donde el uso o método comprende además proporcionar a la planta un bioestimulante basado en aminoácidos.

10 23.El uso del método de acuerdo con la modalidad 22, en donde el bioestimulante basado en aminoácidos comprende entre 8-15 % (p/p) de aminoácidos libres y entre 45-55 % de aminoácidos unidos.

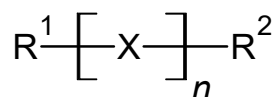
24.El uso del método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 22-23, en donde la composición que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I y el bioestimulante basado en aminoácidos se proporcionan dentro del mismo ciclo de cultivo.

15 25. El uso del método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 22-24, en donde la composición que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I se proporciona al menos 24 horas antes o 24 horas después de que se proporciona el bioestimulante basado en aminoácidos a la planta.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

20 La divulgación proporciona compuestos organosulfurados para usarse como bioestimulantes vegetales, así como métodos para incrementar la tasa de crecimiento, desarrollo, rendimiento, cosecha de una planta y otras características vegetales descritas en la presente.

En algunas modalidades, el compuesto organosulfurado es un compuesto de acuerdo con la fórmula I:



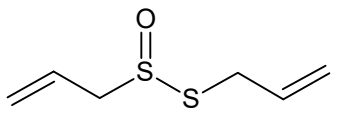
Fórmula I,

en donde n es 2;

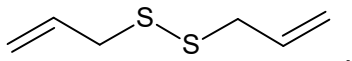
5 en donde una X es -S- y la otra X se selecciona del grupo que consiste en -S-, -S(O)-
y -S(O)₂-;

10 y R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo
opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroalquilo opcionalmente
sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino
opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido y heterocicloalquilo
opcionalmente sustituido.

En modalidades preferidas, el compuesto de acuerdo con la Fórmula I no es



En modalidades preferidas, el compuesto de acuerdo con la Fórmula I no es



15 Los compuestos de acuerdo con la fórmula I se refieren en la presente como
“compuestos organosulfurados” o “los compuestos organosulfurados bioestimulantes”.

Preferentemente, R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste
en alquilo opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido. Más preferentemente, R¹
y R² se seleccionan independientemente de alquilo de C₁₋₆ y fenilo; en donde el grupo fenilo

se sustituye opcionalmente con alquilo de C₁₋₃ o alcoxi de C₁₋₃. Más preferentemente R¹ y R² se seleccionan independientemente de metilo, etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, fenilo, *p*-tolilo y 4-metoxifenilo.

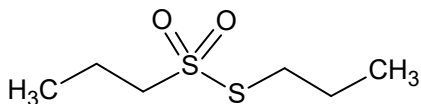
En modalidades preferidas, R¹ y R² son idénticos.

- 5 En modalidades preferidas, cada X es -S-. En modalidades preferidas, una X es -S- y la otra X es -S(O)-. En otras modalidades preferidas, una X es -S- y la otra X es -S(O)₂-.

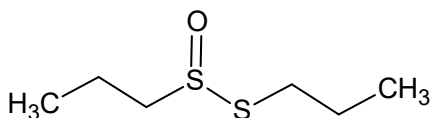
- 10 Preferentemente, el compuesto de la fórmula I se selecciona del compuesto de acuerdo con la fórmula I se selecciona del grupo que consiste en tiosulfonato de di-*n*-propilo (PTSO), metanotiosulfonato de S-metilo, tiosulfonato de S-fenilbenceno, tiosulfinato de di-*n*-propilo (PTS), tiosulfinato de metil metano, tiosulfinato de butil butano, tiosulfinato de metil propeno, disulfuro de di-*n*-propilo, disulfuro de dimetilo, disulfuro de dietilo, disulfuro de di-*n*-butilo, disulfuro de difenilo, disulfuro de di-*p*-tolilo y disulfuro de bis(4-metoxifenilo). Más preferentemente el compuesto de acuerdo con la fórmula I es tiosulfonato de di-*n*-propilo (PTSO) o tiosulfinato de di-*n*-propilo (PTS).

- 15 En modalidades preferidas de la fórmula I, *n* es 2 y una X es -S- y la otra X es -S(O)₂-; y R¹ y R² se seleccionan independientemente de alquilo de C₁₋₆ y fenilo, preferentemente se seleccionan del grupo que consiste en metilo, fenilo y *n*-propilo.

- 20 En modalidades preferidas, el compuesto de la fórmula I es tiosulfonato de propilpropano (PTSO), también referido com tiosulfonato de di-*n*-propilo. PTSO tiene la estructura:



En modalidades preferidas, el compuesto de la fórmula I es tiosulfinato de propilpropano (PTS), también referido com tiosulfinato de di-*n*-propilo. PTS tiene la estructura:



En modalidades preferidas, el compuesto de la fórmula I es tiosulfonato de di-metilo.

En modalidades preferidas, el compuesto de la fórmula I es tiosulfonato de di-fenilo.

PTSO y PTS son compuestos preferidos de la divulgación y se pueden usar
5 conjuntamente o individualmente como bioestimulantes y en los métodos descritos en la presente.

Como se usa en la presente, “alquilo” se refiere a un grupo hidrocarbilo alifático saturado. A menos que se señale de otro modo, un grupo alquilo puede ser lineal o ramificado. Preferentemente, los grupos alquilo son lineales. Como se usa en la presente, los grupos
10 alquilo se pueden sustituir o no sustituir. Preferentemente, los grupos alquilo no se sustituyen. En modalidades preferidas, en la fórmula I un alquilo es un alquilo de C₁₋₆, más preferentemente un alquilo de C₁₋₄.

Como se usa en la presente, “arilo” se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo aromático que comprende de seis a veinticuatro átomos de carbono, más preferentemente
15 seis a doce átomos de carbono, y puede incluir estructuras monocíclicas y policíclicas. Cuando el grupo arilo es una estructura policíclica, es preferentemente una estructura bicíclica. Opcionalmente, el grupo arilo se sustituye por uno o más sustituyentes especificados adicionalmente en este documento. Preferentemente, el grupo arilo se sustituye con un grupo metilo o metoxi. Los ejemplos de grupos arilo son fenilo y naftilo. Más preferentemente, un
20 grupo arilo es fenilo.

Como se usa en la presente, “alquenilo” se refiere a un grupo hidrocarbilo alifático insaturado que comprende uno o más dobles enlaces carbono-carbono. A menos que se señale de otro modo, un grupo alquenilo puede ser lineal o ramificado. Preferentemente, los grupos alquenilo son lineales. Como se usa en la presente, los grupos alquenilo se pueden
25 sustituir o no sustituir. Preferentemente, los grupos alquenilo no se sustituyen. En modalidades preferidas, en la fórmula I un alquenilo es un alquenilo de C₂₋₆, más

preferentemente un alquenilo de C₂₋₄.

5 Como se usa en la presente, “alquinilo” se refiere a un grupo hidrocarbilo alifático insaturado que comprende uno o más triples enlaces carbono-carbono. A menos que se señale de otro modo, un grupo alquinilo puede ser lineal o ramificado. Preferentemente, los grupos alquinilo son lineales. Como se usa en la presente, los grupos alquinilo se pueden sustituir o no sustituir. Preferentemente, los grupos alquinilo no se sustituyen. En modalidades preferidas, en la fórmula I un alquinilo es un alquinilo de C₂₋₆, más preferentemente un alquinilo de C₂₋₄.

10 Como se usa en la presente, “cicloalquilo” se refiere a un grupo hidrocarbilo alifático saturado cíclico. Los grupos cicloalquilo se pueden sustituir o no sustituir. Preferentemente, los grupos cicloalquilo no se sustituyen. En modalidades preferidas, en la fórmula I un cicloalquilo es un

cicloalquilo de C₃₋₆, más preferentemente un cicloalquilo de C₃₋₅.

15 Como se usa en la presente, “heteroalquilo” se refiere a un grupo hidrocarbilo alifático saturado que contiene uno o más heteroátomos. A menos que se señale de otro modo, un grupo heteroalquilo puede ser lineal o ramificado. Preferentemente, los grupos heteroalquilo son lineales. Como se usa en la presente, los grupos heteroalquilo se pueden sustituir o no sustituir. Preferentemente, los grupos heteroalquilo no se sustituyen. En modalidades preferidas, en la fórmula I un heteroalquilo es un heteroalquilo de C₁₋₆, más preferentemente
20 un heteroalquilo de C₁₋₄. Preferentemente, los grupos heteroalquilo contienen uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S. Más preferentemente, los grupos heteroalquilo contienen como máximo dos heteroátomos, más preferentemente un heteroátomo. Los ejemplos de grupos heteroalquilo adecuados incluyen grupos alcoxi (tal como grupos metoxi y etoxi) y éteres.

25 Como se usa en la presente, “heterocicloalquilo” se refiere a un grupo hidrocarbilo alifático saturado cíclico que contiene uno o más heteroátomos. Los grupos heterocicloalquilo se pueden sustituir o no sustituir. Preferentemente, los grupos heterocicloalquilo no se sustituyen. En modalidades preferidas, en la fórmula I un heterocicloalquilo es un

heterocicloalquilo de C₁₋₅, más preferentemente un heterocicloalquilo de C₂₋₄. Preferentemente, un grupo heterocicloalquilo es una estructura de anillo de 5 miembros o 6 miembros que contiene como máximo dos heteroátomos, más preferentemente un heteroátomo. Preferentemente, los grupos heterocicloalquilo contienen heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S.

Como se usa en la presente, “heteroarilo” se refiere a un sistema de anillo aromático que comprende uno o más heteroátomos. Preferentemente, los grupos heteroarilo comprenden al menos dos átomos de carbono (es decir, al menos C₂) y uno o más heteroátomos N, O o S. Preferentemente, los grupos heteroarilo contienen como máximo cinco átomos de carbono. Preferentemente, los grupos heteroarilo contienen como máximo dos heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, O y S. En modalidades preferidas, los grupos heteroarilo son estructuras de anillo de 5 miembros o 6 miembros. Opcionalmente, el grupo heteroarilo se puede sustituir por uno o más sustituyentes especificados adicionalmente en este documento. Preferentemente, los grupos heteroarilo no se sustituyen. Los ejemplos de grupos heteroarilo adecuados incluyen piridinilo, quinolinilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, pirrolilo, furanilo, triazolilo, benzofuranilo, indolilo, purinilo, benzoxazolilo, tienilo, fosfolilo y oxazolilo.

Como se usa en la presente, “sustituido” indica que un grupo contiene uno o más sustituyentes. Preferentemente, los sustituyentes se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno, alquilo de C₁₋₃, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -OH, =O, alcoxi de C₁₋₃, -NH₂, -NH-C₁₋₃ alquilo, -NHC(O)-C₁₋₃ alquilo, -NO₂, -SO₃H y CF₃. Preferentemente, los halógenos se seleccionan del grupo que consiste en -Cl, -F, -Br e -I. En modalidades preferidas, los grupos como se divulgan en la presente contienen como máximo tres sustituyentes, más preferentemente como máximo dos sustituyentes y más preferentemente como máximo un sustituyente.

Se han identificado varios compuestos organosulfurados en extractos de plantas que pertenecen a la familia *Allium*. El propil-propano-tiosufinato (PTS) es un compuesto natural que se encuentra en plantas que pertenecen a la familia *Allium*; en particular *Allium cepa* (cebolla), *Allium ampeloprasum* (puerro), *Allium schoenoprasum* (cebolleta) y *Allium chinense* (cebolla china). El propino se hidroliza por la aliinasa en ácido propilsulfénico que se condensa para producir PTS bajo pérdida de agua (J. Chromatogr. A 1112 (2006) 3–22). Otras

reacciones con PTS dan por resultado la producción de PTSO. Una de las mejores fuentes vegetales para PTS es de *Allium schoenoprasum* (cebolleta) (ver, tabla 3 de Rose et al. Nat. Prod. Rep., 2005, 22, 351–368). A diferencia de PTS, PTSO no está presente en las cebollas. Aunque PTSO se ha descrito en la literatura como “derivado de *Allium*”, los inventores no tienen conocimiento de ninguna literatura que describa la medición de PTSO a partir de extracto de cebolla. El ejemplo 10 demuestra que PTSO no está presente en límites detectables en aceite de cebolla, extracto de cebolla, aceite de ajo o extracto de ajo.

Se reporta que *Allium sativum* (ajo) tiene niveles no detectables de PTS pero cantidades significativas de alicina (es decir, tiosulfinato de dialilo), que no es detectable en extractos de *Allium cepa* (cebolla), *Allium ascalonicum* (chalota) o *Allium schoenoprasum* (cebolleta) (Rose et al.) La alicina se produce, tras el daño de tejido de ajo crudo a partir del aminoácido no proteinogénico aliina (S-alilcisteína sulfóxido) en una reacción que se cataliza por la enzima aliinasa, como un compuesto principal junto con una pequeña cantidad de metil alil tiosulfinato (Molecule, 19, 2014, 12591-12618 y J. Chromatogr. A 1112 (2006) 3–22). La alicina es inestable y se convierte rápidamente en una serie de otros compuestos que contienen azufre, tal como disulfuro de dialilo. Puesto que alicina es un compuesto inestable, su uso en la agricultura es limitado (Fujisawa et al (2008) J Agric Food Chem: 56 (11): 4229-4235).

Los compuestos se pueden extraer a partir de una fuente natural o se pueden producir sintéticamente. Ambos compuestos PTS y PTSO también están comercialmente disponibles. En algunas modalidades, los compuestos se obtienen de fuentes naturales tal como plantas. Los compuestos se pueden extraer del material vegetal de diferentes maneras. El método apropiado depende de las propiedades químicas de los compuestos. Por ejemplo, la extracción puede comenzar con un solvente no polar y seguir con solventes de polaridad creciente. De manera alternativa, los compuestos de la planta se pueden extraer en alcohol.

La divulgación proporciona composiciones que comprenden los compuestos organosulfurados bioestimulantes divulgados en la presente (es decir, de acuerdo con la fórmula I).

En algunas modalidades, la composición comprende al menos 40 %, preferentemente al menos 50 %, de uno o más compuestos organosulfurados. Preferentemente, la

composición comprende al menos 40 %, preferentemente al menos 50 % de PTSO. En algunas modalidades, la composición comprende además PTS, preferentemente menos de 20 %, más preferentemente menos de 10 % PTS. Estas composiciones también se refieren en la presente como una “solución concentrada de compuesto organosulfurado”.

- 5 En algunas modalidades, al menos 60 % en peso, preferentemente al menos 80 % en peso, más preferentemente al menos 95 % en peso, de compuestos organosulfurados de la composición como se divulga en la presente se seleccionan de compuestos de acuerdo con la fórmula I. En algunas modalidades, al menos 60 % en peso, preferentemente al menos 80 % en peso, más preferentemente al menos 95 % en peso, de compuestos organosulfurados
- 10 de la composición como se divulga en la presente se seleccionan de PTSO y PTS.

Las composiciones concentradas en general se diluirán entre 1:100 y 1:100.000 antes del uso para formar soluciones de trabajo. En la presente, se entenderá que “trabajo” indica que la composición, por ejemplo, una solución, se puede aplicar a una planta, y no que otras concentraciones se relacionarían con modalidades no de trabajo.

- 15 Las composiciones adecuadas comprenden al menos 0,5 mg/L de un compuesto organosulfurado descrito en la presente. Preferentemente, la composición comprende al menos 0,5 mg/L, más preferentemente al menos 1 mg/L de compuesto organosulfurado (en particular PTSO). En algunas modalidades, una solución de trabajo comprende al menos 10 mg/L de compuesto organosulfurado (en particular al menos 10 mg/L de PTSO).

- 20 Preferentemente, la composición comprende al menos 1 $\mu\text{mol/L}$, más preferentemente al menos 10 $\mu\text{mol/L}$ de compuesto organosulfurado (en particular PTSO). En algunas modalidades, una solución de trabajo comprende al menos 35 $\mu\text{mol/L}$ de compuesto organosulfurado (en particular al menos 35 $\mu\text{mol/L}$ de PTSO, más particularmente al menos 50 $\mu\text{mol/L}$ de PTSO).

- 25 Preferentemente, la composición, en particular cuando se usa como una solución de trabajo, comprende como máximo 10 mmol/L, más preferentemente como máximo 8 mmol/L de compuesto organosulfurado (en particular PTSO). En algunas modalidades, una solución de trabajo comprende como máximo 6 mmol/L de compuesto organosulfurado (en particular PTSO). En modalidades preferidas, una solución de trabajo comprende como máximo 3,5

mmol/L de PTSO, más preferentemente como máximo 1,5 mmol/L.

En modalidades preferidas, el compuesto de acuerdo con la fórmula I se aplica a plantas (es decir, solución de trabajo) a una concentración de como máximo 200 mg /L, preferentemente como máximo 150 mg /L, más preferentemente como máximo 100 mg /L. En modalidades preferidas, la composición que se aplica a las plantas comprende como máximo 50 mg /L. En algunas modalidades, la composición aplicada a las plantas comprende entre 0,5-150 mg /L, preferentemente entre 0,5-100 mg /L. En algunas modalidades, la composición aplicada a plantas comprende entre 0,5-50 mg/L. En algunas modalidades, la composición aplicada a plantas comprende entre 1-50 mg/L. En algunas modalidades, la composición aplicada a plantas comprende entre 1-10 mg/L.

Como reconocerá un experto, la cantidad de PTSO necesaria dependerá del tamaño del cultivo, ya que los cultivos más grandes en general necesitan cantidades más altas. Como una modalidad de ejemplo, una densidad de plantas promedio puede ser, por ejemplo, 30.000 plantas/ha y se aplican 10.000 litros de solución de PTSO/ha.

En algunas modalidades, las composiciones comprenden compuestos organosulfurados adicionales, que también pueden o no actuar como bioestimulantes. Preferentemente, al menos 60 % en peso de compuestos organosulfurados en esta composición se seleccionan de compuestos de acuerdo con la fórmula I.

En algunas modalidades, cuando la composición comprende tiosulfinato de dialilo, la relación del compuesto o compuestos de acuerdo con la fórmula I a tiosulfinato de dialilo en peso es mayor que 0,1, preferentemente mayor que 1 y más preferentemente al menos 10:1. Se entenderá que cuando la composición comprende más de un compuesto de la fórmula I, el peso de todos estos compuestos se compara con el peso de tiosulfinato de dialilo para llegar a la relación.

En algunas modalidades, cuando la composición comprende disulfuro de dialilo, la relación del compuesto o compuestos de acuerdo con la fórmula I a disulfuro de dialilo en peso es mayor que 0,1, preferentemente mayor que 1 y más preferentemente al menos 10:1. Se entenderá que cuando la composición comprende más de un compuesto de la fórmula I, el peso de todos estos compuestos se compara con el peso de disulfuro de dialilo para llegar

a la relación.

Preferentemente, estas composiciones están sustancialmente libres de tiosulfinato de dialilo. Como se usa en la presente, “sustancialmente libre”, cuando se refiere a composiciones concentradas que tienen, por ejemplo, 50 % o más de PTSO, se refiere a composiciones que comprenden menos de 5 % en peso, preferentemente menos de 1 % en peso, más preferentemente menos de 0,5 % en peso de tiosulfinato de dialilo. Las soluciones de trabajo que se han diluido comprenderán significativamente menos tiosulfinato de dialilo.

Las composiciones de la presente divulgación también están preferentemente sustancialmente libres de disulfuro de dialilo. Como se usa en la presente, “sustancialmente libre”, cuando se refiere a composiciones concentradas que tienen, por ejemplo, 50 % o más de PTSO, se refiere a composiciones que comprenden menos de 5 % en peso, preferentemente menos de 1 % en peso, más preferentemente menos de 0,5 % en peso de disulfuro de dialilo. Las soluciones de trabajo que se han diluido comprenderán significativamente menos disulfuro de dialilo.

Las composiciones pueden incluir cualquier “portador, excipiente y/o solvente agrícolamente aceptable” adecuado. Estos portadores y solventes se conocen por un experto. y no son inaceptablemente dañinos para una planta o su ambiente, y/o no son inseguros para el usuario u otros que puedan estar expuestos. Por ejemplo, un portador agrícolamente aceptable puede ser un portador sólido, un portador de gel, un portador líquido, una suspensión o una emulsión. Un ejemplo no limitante de un solvente es agua.

En modalidades preferidas, las composiciones comprenden además un emulsionante. Los emulsionantes adecuados incluyen propilenglicol y ricinoleato de gliceril polietilenglicol. El extracto de yuka, así como el Tween, también son emulsionantes adecuados. En algunas modalidades, las composiciones comprenden 40-70 % de un emulsionante, preferentemente entre 55-60 % de emulsionante, en particular cuando el emulsionante es una combinación de propilenglicol y ricinoleato de gliceril polietilenglicol. En algunas modalidades, las composiciones comprenden 70-92 % de un emulsionante, preferentemente alrededor de 90 % de emulsionante, en particular cuando el emulsionante es extracto de yuka. En algunas modalidades, las composiciones comprenden 25-70 % de un emulsionante, preferentemente entre 25-35 % de emulsionante, en particular cuando el emulsionante es tween.

Preferentemente, la composición comprende entre 1-30 %, preferentemente 3-10 %, de un compuesto como se divulga en la presente (por ejemplo, PTSO). La composición puede comprender además vitaminas y minerales tal como vitamina H, vitamina B1, B2, B3, B5, B6 y B12. Estas composiciones se pueden diluir a una solución de trabajo que se va a aplicar en la planta como se divulga adicionalmente en la presente.

En algunas modalidades, la composición comprende además un fertilizante, un pesticida, un agente humectante, un compuesto antimicrobiano, desinfectante, compuesto quelante, compuesto aromático y/o un bioestimulante adicional.

Un experto también apreciará que un fertilizante, un pesticida, un agente humectante, un compuesto antimicrobiano, desinfectante, compuesto quelante, compuesto aromático y/o un bioestimulante adicional (en particular un bioestimulante basado en aminoácidos como se describe en la presente) también se puede proporcionar en una composición separada. Por ejemplo, la divulgación contempla además métodos que comprenden proporcionar a la planta un compuesto o composición de la invención como se divulga en la presente y proporcionar a la planta uno o más agentes adicionales seleccionados de fertilizante, un pesticida, un agente humectante, un compuesto antimicrobiano, desinfectante, compuesto quelante, compuesto aromático y/o un bioestimulante adicional. Preferentemente, el agente adicional se proporciona aproximadamente al mismo tiempo que un compuesto de la invención. El agente adicional también se puede proporcionar antes o después de un compuesto de la invención, por ejemplo, varias horas o días antes o después de un compuesto de la invención. Preferentemente, el compuesto de la invención y el agente adicional se proporcionan con 7 días de diferencia entre sí. El agente adicional se proporciona preferentemente varias veces durante un ciclo de cultivo. Por ejemplo, el agente adicional se puede aplicar cada 4-14 días. El agente adicional se puede aplicar al menos 4, preferentemente al menos 6 veces durante un ciclo de cultivo. En particular, la composición que comprende la fórmula I y el agente adicional se proporcionan ambos durante el mismo ciclo de cultivo.

En algunas modalidades, los métodos y usos divulgados en la presente comprenden además aplicar un bioestimulante basado en aminoácidos a una planta. Un “bioestimulante basado en aminoácidos”, como se refiere en la presente, comprende al menos 10 %, preferentemente al menos 15 % (p/p) de aminoácidos. En algunas modalidades, el bioestimulante comprende al menos 50 %, preferentemente al menos 55 % (p/p) de

aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos libres (es decir, aminoácidos de forma libre) o unidos a otros aminoácidos (por ejemplo, mediante enlaces peptídicos). En algunas modalidades, el bioestimulante de aminoácidos comprende entre 8-15 % (p/p) de aminoácidos libres y entre 45-55 % de aminoácidos unidos. Estos bioestimulantes en general se diluyen de 1:10 a 1:1.000 antes del uso.

Los bioestimulantes basados en aminoácidos y su método de uso se conocen por un experto e incluyen Metalosate Calcium y Metalosate Fe (Albion Minerals, Layton, UT, EUA); Agrocean B (Agrimer, Plouguerneau, Francia); Tecamin Brix, Tecamin Max, Tecnokel Amino Mix y Terra-Sorb Foliar (Agritecno Fertilizantes, Valencia, España); Amino Quelant Ca (Bioibérica, Barcelona, España); Bosfoliar Activ (COMPO EXPERT, Münster, Alemania); NaturalCrop SL (NaturalCrop Poland Sp. z o.o., Warsaw, Polonia); y Delfan Plus (Tradecorp, Madrid, España). Véase la tabla 2 de Molecules. 2018 Feb; 23(2): 470 para una descripción de la composición de los bioestimulantes de aminoácidos AminoPrim y AminoHort, que contienen 15 % y 20 % de aminoácidos, respectivamente, y 0,27 % y 2,1 % de microelementos, respectivamente.

El complejo Terra Sorb™ es otro bioestimulante basado en aminoácidos adecuado que comprende 20 % (p/p) de aminoácidos libres; ASP, SER, GLU, GLY, HIS, ARG, THR, ALA, PRO, CIS, TYR, VAL, MET, LYS, ILE, LEU, PHE y TRP. El complejo Terra Sorb también contiene 5,5 % de nitrógeno del cual 5 % es N orgánico, así como B (1,5 %), Mg (0,8 %), Fe (1 %), Zn (0,1 %), Mn (0,1 %), Mo (0,001 %) y 25 % de materia orgánica.

Un bioestimulante basado en aminoácidos preferido es Isabion™. Isabion™ es una mezcla de agua, cenizas, aminoácidos libres, así como péptidos de cadena corta y cadena larga.

Preferentemente, Isabion es una mezcla de 33,5 % (p/p) de agua, 4 % (p/p) de cenizas y 62,50 % (p/p) de materia orgánica. En particular, la mezcla comprende 10,3 % (p/p) de aminoácidos libres y 47,96 % (p/p) de aminoácidos unidos. Los aminoácidos libres incluyen 3,80 % (p/p) de glicina, 1,45 % (p/p) de prolina, 1,87 % (p/p) de alanina, 0,27 % (p/p) de ácido glutámico, 0,85 % (p/p) de hidroxiprolina, 0,35 % (p/p) de ácido aspártico, 0,20 % (p/p) de leucina, 0,35 % (p/p) de lisina, 0,09 % (p/p) de valina, 0,33 % (p/p) de tirosina, 0,16 % (p/p) de fenilalanina, 0,07 % (p/p) de isoleucina, 0,12 % (p/p) de arginina, 0,08 % (p/p) de treonina,

0,08 % (p/p) de metionina, 0,10 % (p/p) de histidina y 0,13 % (p/p) de serina.

Los aminoácidos unidos incluyen 8,65 % (p/p) de glicina, 8,78 % (p/p) de prolina, 5,16 % (p/p) de alanina, 6,33 % (p/p) de ácido glutámico, 5,35 % (p/p) de hidroxiprolina, 2,71 % (p/p) de ácido aspártico, 1,90 % (p/p) de leucina, 1,68 % (p/p) de lisina, 1,67 % (p/p) de valina, 1,14 % (p/p) de tirosina, 1,18 % (p/p) de fenilalanina, 0,87 % (p/p) de isoleucina, 0,80 % (p/p) de arginina, 0,66 % (p/p) de treonina, 0,57 % (p/p) de metionina, 0,37 % (p/p) de histidina y 0,14 % (p/p) de serina.

Además, los aminoácidos unidos pueden ser péptidos de cadena corta y/o péptidos de cadena larga. El peso molecular de los péptidos de cadena corta es en general entre aproximadamente 1160 Da a aproximadamente 3500 Da. El peso molecular de los péptidos de cadena larga es en general entre aproximadamente 3600 Da a aproximadamente 8500 Da.

Isabion usualmente se diluye con agua y se aplica de manera de aspersión foliar o en agua de riego. Cuando se proporciona una solución de trabajo para aspersión foliar, Isabion normalmente se diluye como 200-300 ml/ 100 L de agua.

La dosis recomendada de Isabion es entre 200 ml/hl a 300 ml/hl para la aspersión foliar y 2 l/ha a 3 l/ha para el sistema de riego. En caso de heladas o cultivos afectados, la dosis se puede incrementar hasta 400 ml/hl para aspersión foliar y hasta 4 l/ha para el sistema de riego.

	Aspersión foliar	sistema de irrigación
Cítricos, cereales, cultivos forrajeros, cultivos frutales, cultivos hortícolas, cultivos industriales, olivo, ornamental, vid, remolacha	200-300 cc/100 L de agua Después de heladas y para cultivos afectados: 400 ml/100 L de agua	2-3 l/ha 4 l/ha

En una modalidad de ejemplo, se proporciona un método que comprende proporcionar a la planta un compuesto de acuerdo con la fórmula I, o una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I y proporcionar a la planta un bioestimulante basado en aminoácidos tal como Isabion™.

En algunas modalidades, el compuesto de acuerdo con la fórmula I y el bioestimulante basado en aminoácidos se proporcionan en una composición individual. Por consiguiente, la divulgación proporciona composiciones que comprenden un compuesto de acuerdo con la fórmula I y un bioestimulante basado en aminoácidos.

5 En algunas modalidades, una composición comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I, glicina y prolina. En algunas modalidades, una composición comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I y aminoácidos libres seleccionados del grupo que comprende glicina y prolina. Preferentemente, comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I, aminoácidos libres seleccionados del grupo que comprende glicina y prolina, y
10 péptidos.

Preferentemente, la composición comprende además aminoácidos libres seleccionados del grupo que comprende alanina, ácido glutámico e hidroxiprolina; más preferentemente, la composición comprende incluso además aminoácidos libres seleccionados del grupo que comprende ácido aspártico, leucina, lisina, valina, tirosina, fenil-
15 alanina, isoleucina, arginina, treonina, metionina, histidina y serina.

En algunas modalidades se proporciona una composición, que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I; alanina, ácido glutámico, hidroxiprolina, ácido aspártico, leucina, lisina, valina, tirosina, fenil-alanina, isoleucina, arginina, treonina, metionina, histidina, serina, glicina y prolina como aminoácidos libres; y péptidos.

20 En una modalidad preferida, la composición que comprende la fórmula I como se describe en la presente y el bioestimulante basado en aminoácidos como se describe en la presente se proporcionan como composiciones separadas. Preferentemente, la composición que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I se proporciona al menos 24 horas antes (o entre 1-3 días antes) o 24 horas después (o entre 1-3 días después) de que se
25 proporciona el bioestimulante basado en aminoácidos a la planta. También se proporciona un kit de partes que comprende i) una composición que comprende la fórmula I como se describe en la presente y ii) un bioestimulante basado en aminoácidos como se describe en la presente.

En modalidades preferidas, la composición que comprende la fórmula I comprende además cadmio (Cd) en una cantidad de como máximo 1,5 mg/kg de materia seca. En

modalidades preferidas, la composición comprende cromo hexavalente (Cr VI) en una cantidad de como máximo 2 mg/kg de materia seca. En modalidades preferidas, la composición comprende plomo (Pb) en una cantidad de como máximo 120 mg/kg de materia seca. En modalidades preferidas, la composición comprende mercurio (Hg) en una cantidad de como máximo 1 mg/kg de materia seca. En modalidades preferidas, la composición comprende níquel (Ni) en una cantidad de como máximo 50 mg/kg de materia seca. En modalidades preferidas, la composición comprende arsénico inorgánico (As) en una cantidad de como máximo 40 mg/kg de materia seca. En modalidades preferidas, la composición comprende zinc inorgánico (Zn) en una cantidad de como máximo 1500 mg/kg de materia seca.

tiosulfonato de di-metilo, tiosulfonato de di-fenilo

La divulgación proporciona los compuestos organosulfurados y composiciones que comprenden los compuestos como se divulga en la presente, para usarse como bioestimulantes vegetales. Estos compuestos y composiciones se pueden usar en métodos para tratar plantas. Estos métodos pueden ser útiles para incrementar la tasa de crecimiento y/o desarrollo de plantas, incrementar el rendimiento de las plantas o incrementar la cosecha de plantas.

En algunas modalidades, se proporcionan métodos que comprenden proporcionar a una planta los compuestos o composiciones divulgadas en la presente. Se puede proporcionar una planta con los compuestos o composiciones por cualquier medio conocido en la técnica tal como tópico, alimentación de riego, aspersión o solución húmeda, recubrimiento, apilamiento, solución aérea, epidérmica, intravascular mediante las raíces, flores, hojas y tallos. Las vías preferidas son captación mediante las raíces, aspersión, administración aérea o tópica. Una vía de administración preferida es mediante raíces usando riego (por ejemplo, riego por goteo/chorreo). En tanto que no se desea que se limite por teoría, proporcionar los compuestos directamente a las raíces puede proporcionar un efecto mejorado sobre, por ejemplo, la aspersión de las hojas. Comparar los resultados entre el riego por aspersión y por goteo en la tabla 17. La aspersión de las plantas también puede ser efectiva, en particular cuando la composición es capaz de empaparse en el suelo y alcanzar las raíces.

En algunas modalidades, un compuesto de la invención se proporciona varias veces

durante un ciclo de cultivo. Como se usa en la presente, un ciclo de cultivo se refiere al tiempo desde la germinación hasta la cosecha.

Por ejemplo, el compuesto se puede aplicar al menos 4, preferentemente al menos 6 veces durante un ciclo de cultivo. Preferentemente, el compuesto se aplica cada 4-27 días, en particular cada 4-14 días. En una modalidad de ejemplo, el compuesto se proporciona cada 1-2 semanas. En una modalidad de ejemplo, el compuesto se proporciona cada 4-27 días, preferentemente cada 4-14 días y al menos 4, preferentemente al menos 6, veces durante un ciclo de cultivo. La primera administración de este compuesto es preferentemente poco después de la germinación. Aunque el efecto de los compuestos dura varias semanas después de la última administración, se recomienda aplicar el compuesto al menos hasta 7 días antes de la cosecha esperada.

Estos compuestos o composiciones se pueden aplicar a una planta (incluidos esquejes, plántulas emergentes y vegetación establecida, incluidas raíces y porciones sobre el suelo, por ejemplo, hojas, tallos, flores, frutas, ramas, ramos, raíz y similares), a la semilla de una planta (por ejemplo, antes de la germinación) o al suelo circundante, en particular la rizosfera de planta. Como se usa en la presente, el término rizosfera se refiere al área de suelo adyacente a las raíces de plantas vivas. El ancho de la rizosfera en general está dentro de 100 mm de la superficie de raíz.

Los compuestos y composiciones se pueden aplicar en una administración individual o como múltiples administraciones. Por ejemplo, las composiciones se pueden proporcionar diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. En una modalidad de ejemplo, la composición se puede proporcionar una vez al día durante una semana o hasta que el bioestimulante se vuelva efectivo.

El riego de las plantas se realiza como vueltas de riego y la cantidad de agua suministrada se elige de tal manera que las plantas descarguen una parte del agua suministrada como drenaje. Esto significa que las composiciones organosulfuradas se enjuagan relativamente rápido. Para permitir una concentración uniforme en el sustrato de raíz, las composiciones organosulfuradas se pueden dosificar como un granulado que libera la composición a la velocidad deseada. De esta manera, se proporcionan concentraciones constantes durante períodos más largos.

En algunas modalidades, las composiciones divulgadas en la presente se proporcionan como una solución de aspersión. Cuando las composiciones se rocían sobre las plantas, la solución se puede depositar sobre las hojas como gotas con una pequeña relación de volumen superficial que se evapora, que puede conducir a que las composiciones permanezcan de las hojas como un residuo. Este efecto se puede reducir al incluir un agente humectante a las composiciones.

La cantidad de compuestos organosulfurados aplicados dependerá de una variedad de factores que incluyen, el método de administración, el tiempo de administración, la velocidad de descomposición del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, tratamiento pesticida, compuestos y/o materiales usados en combinación, la edad, peso, salud general y tratamientos previos, y factores similares conocidos en las artes agrícolas. Un horticultor, cultivador de plantas o agricultor con experiencia ordinaria en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad efectiva de la composición requerida.

Está claro para un experto que se pueden administrar concentraciones/cantidades más bajas de los compuestos organosulfurados a plantas de crecimiento lento, por ejemplo, cactus y suculentas. También está claro para un experto que las concentraciones/cantidades en agua y la frecuencia de aplicación dependen de la especie de planta, subespecie, cultivar, híbrido, variante. Además, está claro para un experto en la técnica que la dosis que las plantas pueden tolerar depende de la etapa de crecimiento y tamaño de la planta. Además, está claro para un experto en la técnica que las concentraciones/cantidades en agua y la frecuencia de aplicación dependen de las condiciones de crecimiento, por ejemplo, luz, temperatura, evaporación, concentración de nutrientes y pH en el sustrato de raíz, movimiento de aire y la aplicación de otros pesticidas. Además, está claro para un experto en la técnica que las concentraciones/cantidades en agua y la frecuencia de aplicación dependen del momento en que se administra, día, noche y la estación y las condiciones climáticas.

En una modalidad de ejemplo, el compuesto organosulfurado, preferentemente PTSO, se proporciona en una cantidad de 0,01 kg/ha a 100 kg/ha.

Preferentemente, para uso en orquídeas, preferentemente *Phalaenopsis*, el compuesto organosulfurado, preferentemente PTSO, se proporciona en una cantidad de 10 kg/ha a 100 kg/ha, más preferentemente de 20 kg/ha a 60 kg/ha. Preferentemente, para uso

en *Chrysanthemum*, el compuesto organosulfurado, preferentemente PTSO, se proporciona en una cantidad de 0,01 kg/ha a 1 kg/ha, más preferentemente de 0,01 kg/ha a 0,25 kg/ha.

5 En algunas modalidades, el compuesto de la fórmula I, o una composición que comprende el compuesto, se aplica directamente a la planta, a la semilla de la planta o al suelo de la planta o semilla.

Como se demuestra en los ejemplos, los compuestos divulgados en la presente tienen efectos ventajosos en las plantas, en particular en las características de calidad de las plantas. Estos compuestos son, por lo tanto, útiles como aditivos de plantas/suelos, fertilizantes y bioestimulantes.

10 En una modalidad preferida, el término “bioestimulante”, como se usa en la presente, se refiere a un producto, en particular un compuesto o composición, que estimula los procesos nutricionales de una planta independientemente del contenido de nutrientes del producto con el objetivo de mejorar una o más de las siguientes propiedades de la planta o la rizosfera de planta: a) eficiencia de uso de nutrientes, b) tolerancia al estrés abiótico, c) rasgos de calidad
15 (también conocidos como características de calidad) y d) disponibilidad de nutrientes confinados en el suelo o rizosfera.

En una modalidad preferida, el uso de un compuesto como se describe en la presente como bioestimulante, se refiere a mejorar uno o más de lo siguiente:

20 a) eficiencia de uso de nutrientes, b) tolerancia al estrés abiótico, c) rasgos de calidad y d) disponibilidad de nutrientes confinados retenidos en el suelo o en la rizosfera.

En modalidades preferidas, el uso como bioestimulante no abarca el uso como agente antimicrobiano y/o antifúngico.

Preferentemente, los compuestos organosulfurados divulgados en la presente:

- incrementan la eficiencia de uso de nutrientes y/o

- incrementan la tolerancia de una planta al estrés abiótico y/o
- mejoran las características de calidad de una planta y/o
- incrementan la disponibilidad de nutrientes retenidos en el suelo o en la rizosfera para una planta.

5 Más preferentemente, los compuestos organosulfurados divulgados en la presente:

- - incrementan la eficiencia de uso de nutrientes y/o
- - incrementan la tolerancia de una planta al estrés abiótico y/o
- - mejoran las características de calidad de una planta.

Eficiencia de uso de nutrientes

- 10 Como se usa en la presente, la eficiencia de uso de nutrientes se usa en su definición normal en la técnica. Habitualmente, la eficiencia de uso de nutrientes se define como el rendimiento (biomasa) por unidad de entrada (fertilizante, contenido de nutrientes) (ver, por ejemplo, Nutrient Use Efficiency in Plants, Concepts and Approaches, Editors: Hawkesford, Malcolm J., Kopriva, Stanislav, De Kok, Luit J. (Eds.) ISBN 978-3-319-10635-9).
- 15 Preferentemente, el nutriente es nitrógeno (N) y/o fósforo (P).

- 20 El experto en la técnica es consciente de los métodos para determinar la eficiencia de uso de nutrientes de una planta y por lo tanto, también es completamente capaz de establecer si un bioestimulante incrementa la eficiencia de uso de nutrientes. Por ejemplo, en estudios de campo, las eficiencias de uso de nutrientes se pueden calcular con base en las diferencias en el rendimiento de cultivos y/o captación de nutrientes entre parcelas tratadas con un bioestimulante y un control no tratado, o al usar nutrientes etiquetados con isótopos para estimar la recuperación de cultivos y suelos de los nutrientes aplicados (ver, por ejemplo, A. Dobermann, Nutrient use efficiency – measurement and management, en: Fertilizer Best Management Practices, 2007, ISBN: 2-9523139-2-X).

Estrés abiótico

Como se usa en la presente, el estrés abiótico se define como el impacto negativo de factores no vivos en organismos vivos en un ambiente específico. Como tal, una mejora de la tolerancia de una planta al estrés abiótico indica que la planta es más capaz de tolerar factores de estrés abiótico que habitualmente tienen un impacto negativo en la planta, por ejemplo, reducción de velocidad de crecimiento de la planta. Los factores de estrés abiótico incluyen, pero no se limitan a, sequía, exceso de agua (en particular, demasiada lluvia o humedad demasiado alta), demasiada o muy poca luz solar directa, viento fuerte, estructura del suelo subóptima, salinidad (en particular hipersalinidad), temperaturas demasiado bajas o demasiado altas, fluctuaciones de temperatura fuertes y/o repentinas y otros extremos ambientales. Por el contrario, los patógenos de plantas o plagas de insectos se refieren como estrés biótico.

El impacto negativo en la planta que resulta del estrés abiótico incluye, pero no se limita a, una velocidad de crecimiento más lenta de la planta, menor altura máxima de la planta, formación disminuida de raíces, desarrollo inadecuado de hojas (tal como hojas más pequeñas, hojas que tienen un color diferente), mayor susceptibilidad al daño por insectos o daño por patógenos, y menos flores o tallos de flores.

Una mejora promedio de la tolerancia al estrés abiótico de una planta como resultado de tratar una planta con un bioestimulante se puede medir al comparar parcelas con plantas tratadas con un bioestimulante con un control no tratado, en donde las plantas tratadas y las plantas de control se someten a sustancialmente los mismos factores de estrés abiótico, por ejemplo, cuando las plantas tratadas y las plantas de control se cultivan en las mismas parcelas o en parcelas vecinas.

En una modalidad preferida, el estrés abiótico es sequía, exceso de agua, luz solar directa, calor y/o frío, que da por resultado crecimiento más lento, formación disminuida de raíces, hojas pálidas o rojas, mayor susceptibilidad al daño por insectos o patógenos y/o menos flores o tallos de flores, en una planta del género *Phalaenopsis*.

En una modalidad preferida, el estrés abiótico se refiere a la captación de muy pocos nutrientes o muy poca agua debido a la falta de raíces suficientes, temperaturas demasiado

altas y/o movimiento de aire que da por resultado formación de raíces pobre y lenta en una planta del género *Chrysanthemum*.

Rasgos de calidad

- La definición de rasgos de calidad (también conocidos como características de calidad)
- 5 puede depender del género o especie de planta. Habitualmente, el experto en la técnica, por ejemplo, un agricultor o un cultivador, sabe qué planta se refiere a qué rasgo de calidad.

Más adelante se describen algunos ejemplos de cultivos/plantas ornamentales y algunas de sus características de calidad. Otros rasgos de calidad se describen en la tabla 31.

Cultivo	Característica de calidad
Papa	Firmeza Forma Cáscara regular y de color Sin tubérculo germinado
Cebollas	Firmeza Forma Color bulbo no brotado
lechuga	Color de hoja Sin márgenes de hoja desviados Firmeza No demasiado compacto
achicoria	Blanco/verde pálido Sin manchas marrones Sin márgenes de hoja desviados
Plantas ornamentales	
Chrysanthemum	Número correcto de flores, tamaño de flor Relación correcta de flores/cogollos Tallos de longitud correcta Todos los tallos tienen la misma longitud

	Sin manchas en hojas y flores
Phalaenopsis	Muchas flores Número de tallos de flores Firmeza de planta Forma de las hojas Hojas de color Sin manchas en las hojas Brillo en las hojas
Helechos	Hojas de color sin partes amarillas/marrones en las hojas Firmeza de planta Presencia de raíces externas

El término “mejora en la calidad de planta” se refiere a la mejora cualitativa o cuantitativa de ciertos rasgos en comparación con el mismo rasgo en una planta de control que se ha cultivado bajo las mismas condiciones en la ausencia de la aplicación de los compuestos divulgados en la presente. Estos rasgos incluyen, pero no se limitan a, apariencia visual mejorada de la planta, calidad mejorada del material cosechado, por ejemplo, semillas, frutas, hojas, verduras; incluida mejora visual del material cosechado, contenido nutricional mejorado, vida útil mejorada, etc.

En algunas modalidades, la calidad de planta es vigor de planta. El vigor de planta mejorado incluye, por ejemplo, vitalidad de planta mejorada de la planta; soporte de planta mejorado; emergencia mejorada; y/o sistema de raíz más desarrollado; nodulación mejorada; cuerpo de hoja más grande; color de hoja mejorado, tamaño de planta incrementado; peso de planta incrementado; altura de planta incrementada; rendimiento incrementado cuando se cultiva en suelos pobres o clima desfavorable; floración/fructificación/germinación/madurez de grano más temprana; maduración más rápida y más uniforme; y similares.

En algunas modalidades, la calidad de planta es el rendimiento de planta y se refiere al rendimiento de una planta (por ejemplo, granos, nueces, frutas, verduras, semillas, etc.). El rendimiento de planta mejorado incluye, por ejemplo, un incremento en la producción de biomasa y una capacidad mejorada para cosechar materia vegetal.

En algunas modalidades, las características de calidad mejoradas se refieren a una o más de las siguientes características seleccionadas de apariencia visual mejorada de la planta, calidad mejorada del material cosechado, contenido nutricional mejorado, vida útil mejorada, vigor de planta mejorado y rendimiento de planta mejorado.

5 Disponibilidad de nutrientes confinados retenidos en el suelo o en la rizosfera

10 Como el experto en la técnica es consciente, parte de los nutrientes se pueden confinar en el suelo o en la rizosfera, lo que hace que cierta cantidad de nutrientes no esté disponible para la planta. Los nutrientes confinados incluyen, pero no se limitan a, nutrientes con baja movilidad en el suelo o rizosfera y/o nutrientes que son poco solubles en agua. La baja

10 movilidad puede ser, por ejemplo, el resultado de la interacción del nutriente con otros componentes del suelo, tal como partículas de tamaño de arcilla o materia orgánica asociada a minerales. Las interacciones fisicoquímicas entre el nutriente y el otro componente de suelo pueden dar por resultado una disponibilidad limitada del nutriente para la planta (Jilling et al. Biogeochemistry (2018) 139: p. 103–122).

15 Están disponibles diferentes métodos para medir la disponibilidad de nutrientes confinados en el suelo y la rizosfera (ver, por ejemplo, Brinkley y Vitousek, Soil nutrient availability, en: Plant Physiological Ecology: Field Methods and Instrumentation (ed. por Pearcy, Ehleringer, Mooney, y Rundel), 2000, ISBN: 13:978-0-412-40730-7).

Además, se proporcionan métodos para:

20 - incrementar la velocidad de crecimiento y/o desarrollo de plantas,

- incrementar el rendimiento de las plantas,

- incrementar la cosecha de plantas. Como se entiende por la persona experta, un incremento en, por ejemplo, en la velocidad de crecimiento de una planta se refiere al incremento de la velocidad de crecimiento de una plantada tratada con un compuesto

25 divulgado en la presente en comparación con la velocidad de crecimiento de una planta cultivada bajo condiciones similares sin tratamiento.

Como se usa en la presente, el término “planta” abarca plantas de cultivo, plantas ornamentales, árboles, gramíneas, plantas anuales, plantas perennes o cualquier otro miembro comúnmente cultivado del reino *Plantae*. El término “planta de cultivo”, como se usa en la presente, incluye especies de plantas con valor comercial, que se plantan y cultivan para uso comercial. Por lo tanto, las plantas de cultivo incluyen plantas florales y no florales, perennes y anuales, árboles, arbustos, hortalizas, árboles frutales, césped y cobertura de suelo.

Las plantas adecuadas incluyen *Cymbidium*, *Oncidium*, *Miltonia*, *Paphiopedilum*, *Cypripedium*, *Calanthe* y los híbridos del género de orquídeas, *Bromelia*, *Begonia*, *Impatiens*, *Azalea*, helechos; los cultivos hortícolas pimiento dulce, tomate, berenjena, pepino, calabacín, etc; los cultivos herbáceos: trigo, papa, remolacha, faena, Luzerne, etc.; cultivos hortícolas cultivables, endivia, coliflor, Coles de Bruselas, lechuga, brócoli, achicoria, guisantes, frijoles, repollo rojo, col rizada, etc; las plantas de jardín *Azalea*, magnolia, forsitia, peonía, malvarrosa, laburno, palmera, glicina, etc.; árboles frutales y arbustos: manzano, peral, cerezo, ciruelo, grosella, grosella negra, arándano, arándano rojo, etc.; frutas tropicales: plátano, papaya, yuca, piña, aguacate, mango, etc.

Preferentemente la planta pertenece al clado *Embryophyta*. Preferentemente, la planta es una planta vascular. En modalidades de ejemplo, la planta es una planta de cultivo tal como *Lactuca sativa* (lechuga).

En otras modalidades preferidas, la planta pertenece al clado *Angiospermae*. Preferentemente, la planta pertenece a una familia seleccionada del grupo que consiste en solanáceas (*Solanaceae*), pepino (*Cucurbitaceae*), rosas (*Rosaceae*), orquídeas (*Orchidaceae*), lirios (*Liliaceae*), compuestos (*Asteraceae* o *Compositae*), clavel (*Caryophyllaceae*), crucíferas (*Brassicaceae* o *Cruciferae*), gramíneas (*Poaceae*) y umbelíferas (*Apiaceae* o *Umbelliferae*).

En una modalidad preferida, la planta pertenece a la familia de solanáceas (*Solanaceae*). Preferentemente, la planta pertenece al género *Solanum* o *Capsicum*. Preferentemente, la planta pertenece al género *Solanum* y se selecciona del grupo que consiste de tomate (*S. lycopersicum*), papa (*S. tuberosum*), berenjena (*S. melongena*) y pepino (*S. muricatum*). En otras modalidades preferidas, la planta pertenece al género

Capsicum y pertenece a la especie pimienta (*C. annuum*), en particular pimienta dulce, chile y jalapeño.

En una modalidad preferida, la planta pertenece a la familia de pepinos (*Cucurbitaceae*). Preferentemente, la planta pertenece al género *Cucumis* o *Cucurbita*.

- 5 Preferentemente, la planta pertenece al género *Cucumis* y se selecciona del grupo que consiste en pepino (*C. sativus*), melón de azúcar y pepinillo (*C. anguria*). En otras modalidades preferidas, la planta pertenece al género *Cucurbita* y se selecciona del grupo que consiste en *C. pepo* (en particular calabacín) y calabazas (*C. argyrosperma*, *C. digitata*, *C. maxima* y *C. moschata*).

- 10 En una modalidad preferida, la planta pertenece a la familia de las rosas (*Rosaceae*). Preferentemente, las plantas pertenecen a un género seleccionado del grupo que consiste en fresas (*Fragaria*), peras (*Pyrus*), manzanas (*Malus*), rosas (*Rosa*) y *Rubus* (en particular del subgénero *Rubus*, a saber, moras).

- 15 En una modalidad preferida, la planta pertenece a la familia de las orquídeas (*Orchidaceae*). En modalidades de ejemplo, la planta es una planta ornamental tal como una orquídea, en particular del género *Phalaenopsis*, u otra planta con flores tal como del género *Cymbidium*.

En una modalidad preferida, la planta pertenece a la familia de los lirios (*Liliaceae*). Preferentemente, la planta pertenece al género de tulipanes (*Tulipa*) o lirios (*Lilium*).

- 20 En una modalidad preferida, la planta pertenece a la familia compuesta (*Asteraceae* o *Compositae*). Preferentemente, la planta pertenece al género de *Chrysanthemum*, *Asterea* o *Lactuca*.

En una modalidad preferida, la planta pertenece a la familia de claveles (*Caryophyllaceae*).

- 25 En una modalidad preferida, la planta pertenece a la familia de crucíferas (*Brassicaceae* o *Cruciferae*). Preferentemente, la planta pertenece al género *Brassica*.

En una modalidad preferida, la planta pertenece a la familia de gramíneas (Poaceae). Preferentemente, la planta pertenece al género de Triticum, Oryza o Zea.

En una modalidad preferida, la planta pertenece a la familia de las umbelíferas (*Apiaceae* o *Umbelliferae*). Preferentemente, la planta se selecciona del grupo que consiste en zanahorias (*Caucus carota*), chirivía (*Pastinaca sativa*), anís (*Pimpinella anisum*), cilantro (*Coriandrum sativum*), comino (*Cuminum cyminum*). En algunas modalidades, la planta no es comino.

Preferentemente, la planta se selecciona del grupo que consiste en *Phalaenopsis*, *Cymbidium*, *Chrysanthemum*, *Rosa*, *Fabaceae* (preferentemente *Phaseolus*, más preferentemente *Phaseolus vulgaris*), *Brassica* (preferentemente *Brassica oleracea* y *Brassica rapa*), Cucurbita (preferentemente *Cucurbita pepo giromontiina*, *Cucumis melo* y *Cucumis sativus*), *Solanaceae* (preferentemente *Solanum* o *Capsicum*, más preferentemente *Solanum lycopersicum* o *Capsicum annuum*), *Vitis* (preferentemente *Vitis vinifera*), *Vaccinia* (preferentemente *Vaccinia corymbosum* o *Vacciniumcyanococcusi*) y *Lactuca* (preferentemente *Lactuca sativa*).

Como se usa en la presente, “comprender” y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitante para significar que se incluyen artículos después de la palabra, pero no se excluyen artículos que específicamente no se mencionan. Además, el verbo “consistir” se puede reemplazar por “consistir esencialmente en”, que significa que un compuesto o compuesto adjunto como se define en la presente puede comprender uno o más componentes adicionales a los identificados específicamente, el o los componentes adicionales no alteran la característica única de la invención.

Los artículos “un” y “una” se utilizan en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

La palabra “de manera aproximada” o “aproximadamente” cuando se usa en asociación con un valor numérico (de manera aproximada 10, aproximadamente 10) significa preferentemente que el valor puede ser el valor dado de 10 más o menos 1 % del valor.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que simplemente sirven para aclarar la invención.

EJEMPLOS

Los presentes experimentos demuestran por primera vez el efecto de PTSO/PTS como bioestimulante. A pesar de que las condiciones de crecimiento (riego, fertilización, luz, temperatura, movimiento de aire, humedad de aire) fueron óptimas para la planta de maceta ornamental híbrida de *Phalaenopsis* “Seda pura”, la administración de diferentes cantidades de PTSO/PTS dio por resultado mayores velocidades de crecimiento y características mejoradas de la planta, como se demuestra en el ejemplo 2. En períodos de altas temperaturas y mucha luz en el invernadero, las plantas tratadas continuaron creciendo a altas tasas, en tanto que el crecimiento de las plantas no tratadas se desaceleró. Aparentemente, las plantas tratadas con PTSO fueron más capaces de resistir períodos de estrés abiótico incrementado.

El ejemplo 3 muestra que el tratamiento de esquejes de *Chrysanthemum* con diferentes cantidades de PTSO/PTS dio por resultado crecimiento incrementado y mejor desarrollo de raíces. En este diseño experimental, los esquejes tratados se compararon con esquejes no tratados bajo las mismas condiciones para un enraizamiento y precrecimiento óptimos de los esquejes. En este ejemplo, el tratamiento con PTSO/PTS demostró formación incrementada de raíces y crecimiento de los esquejes en comparación con los esquejes no tratados bajo condiciones óptimas. Además, estos experimentos también mostraron un efecto adicional de una captación de nutrientes más eficiente. Esto indica que las composiciones de PTSO/PTS usadas en la presente son bioestimulantes.

Ejemplo 1 Aislamiento de PTSO y PTS.

Alcance:

Para varios ejemplos descritos en la presente, se usó un extracto acuoso de PTSO, referido en la presente como EXTRACTO de PTSO (PE), que comprende al menos 56 % en peso de PTSO y hasta 14 % en peso de PTS.

Diseño de estudio: el orden de elución de los compuestos de acuerdo con su polaridad se estima a partir de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Las condiciones para la separación se determinan por cromatografía de capa fina (TLC) usando heptano y acetato de etilo como fase móvil. Una columna flash con una longitud de 110 cm y un diámetro de 25 cm se empaquetó con 15 kg de sílice (tamaño de partícula 40-60 µm de ACROS Organics™) en heptano y la columna se dejó estabilizar durante la noche. La purificación se llevó a cabo al incrementar la polaridad gradualmente de 0 % a 40 %. Las fracciones de interés, PTS (= pico 6) y PTSO (= pico 7), ambas identificadas por resonancia magnética nuclear de protones (¹H-RMN), comenzaron a eluir después de 20 litros de uso de fase móvil y se recolectaron en un tamaño de fracción de 2 litros. Las fracciones se separaron de acuerdo con la identificación por TLC de cada compuesto y las fracciones correspondientes para cada compuesto (PTS o PTSO) se combinaron. El solvente se evaporó por evaporación giratoria para obtener una fracción purificada de PTS (32435-2-A) y dos fracciones purificadas de PTSO (MHA32435-2-B, MHA32435-2-C) como se describe en la tabla 1.

La pureza requerida de >98 % solo se logró con la fracción MHA32435-2-B (= PTSO) en tanto que la fracción MHA32435-2-A (PTS) y MHA32435-2-C (= 2ª fracción de PTSO) mostraron una pureza < 98 % y necesitaron purificación adicional individualmente por una segunda cromatografía rápida para obtener la pureza deseada.

La repurificación de PTS (MHA32435-2-A) se llevó a cabo al empaquetar una columna flash (50 cm de longitud y 20 cm de diámetro) con 2 kg de sílice (tamaño de partícula 40-60 µm de ACROS Organics™), usando acetato de etilo y heptano como fase móvil y al incrementar la polaridad de 0 % a 20 %. Las fracciones de interés se recolectaron en un tamaño de fracción de 250 ml, se identificaron por TLC y se combinaron. El solvente se evaporó por evaporación giratoria para obtener PTS (EWR32514-01-1) con >98 % de pureza.

La repurificación de la fracción impura de PTSO (MHA32435-2-B) se realizó en la misma columna ultrarrápida, usando la misma fase móvil que para MHA32435-2-A con la diferencia de 3 kg de sílice (para empaquetar la columna), incrementando la polaridad de 0 % a 30 %, y el tamaño de la fracción fue 100 ml. La repurificación dio por resultado dos fracciones (EWR32514-02-1 y EWR32514-02-02) de PTSO con una pureza >98 % como se describe en la tabla 1.

Tabla 1: Pureza de pico 6 y pico 7 y % de recuperación del EXTRACTO de PTSO

1er paso de purificación de PTS (pico 6) y PTSO (pico7 EXTRACTO DE PTSO (992 g)					
Picos	Peso (g)	HPLC	¹ H-rmn	(%) de Pureza	% de Recuperación
6 (= PTS)	64	MHA32435-2-A	MHA-32435-2-A	93	6
7(= PTSO)	651	MHA32435-2-C	MHA-32435-2-C	99	86 (de ambas fracciones)
7(= PTSO)	198	MHA32435-2-B	MHA-32435-2-B	72	
2º paso de repurificación de fracciones relacionadas con pico 6 y pico 7 (fr. con 72 % de pureza)					
6 (= PTS)	46	EWR32514-01-1	EWR32514-01-4	99	5
7 (= PTSO)	123	EWR32514-02-1	EWR32514-02-4	99	82 (de todas las fracciones con pureza >98 %)
7 (= PTSO)	39	EWR32514-02-02	EWR32514-02-5	99	

A partir de este ejemplo se demuestra que PTSO y PTS se purificaron hasta alta pureza.

Para los ejemplos 2-5 descritos más adelante, el EXTRACTO de PTSO (PE) contiene 5 56 % de PTSO y alrededor de 30 % de ricinoleato de gliceril polietilenglicol.

Ejemplo 2. Tratamiento de plantas ornamentales

Alcance: en este ejemplo se demostró el efecto bioestimulante del EXTRACTO de PTSO. Para este propósito, se seleccionó la orquídea *Phalaenopsis* "Seda pura". El crecimiento y desarrollo de las plantas abarca tres etapas: (1) crecimiento vegetativo, (2) 10 inducción de flores y (3) desarrollo de tallos de flores.

Después de los tratamientos como se menciona más adelante, las plantas se evaluaron al final del período de inducción de flores. En el momento de la venta se evaluó la floración de las plantas.

Procedimiento de cultivo de plantas

Las plantas de *Phalaenopsis* “seda pura” (Floricultura B.V.) se produjeron a partir de meristemas y se cultivaron previamente. Tras la entrega en el agricultor de *Phalaenopsis*, las plantas se procesaron de acuerdo con el siguiente procedimiento. Las plantas se colocaron en una maceta transparente de 12 cm en una corteza de tamaño mediano (Proveedor: Bas van Buuren B.V., De Lier), cultivada durante 30 semanas a 29 °C, y regada cada 5 días con agua más fertilizante (100 litros por m²) (EC 1.1).

Si era necesario, las plantas se expusieron a luz artificial (de 7:00 a.m. a 6:00 p.m.). Para la inducción de flores, las plantas se enfriaron y se cultivaron durante dos meses a 19 °C. Posteriormente, las plantas se mantuvieron durante 3-4 meses a 20 – 25 °C, y se expusieron opcionalmente a luz artificial si era necesario. De esta manera, se obtuvieron plantas con flores que tuvieron el tamaño apropiado en línea con las demandas del mercado.

En julio de 2020, las plantas jóvenes de *Phalaenopsis* se colocaron en una maceta en la corteza. Julio fue un mes caluroso y soleado, y a pesar de que el agricultor estaba usando pantallas de sombra, las plantas mostraron hojas colgantes y delgadas que tuvieron un color verde oscuro/rojizo, con poco progreso de crecimiento. Esto indicó que las plantas sufrieron estrés abiótico. El número de raíces y crecimiento de raíces, se monitoreó por inspección visual a través de las macetas transparentes. Se observaron variaciones considerables en el número de raíces y el crecimiento de raíces dentro de la población de plantas.

El siguiente diseño experimental se configuró con el objetivo de determinar la sensibilidad de las plantas para diferentes diluciones y el número de tratamientos con EXTRACTO de PTSO. Las áreas de 1 m² (que contienen aproximadamente 100 plantas) se trataron con diluciones de extracto que contiene PTSO/PTS y se regaron manualmente con diluciones en agua (10 L/m²), de la siguiente manera. El riego manual con el EXTRACTO de PTSO diluido tuvo lugar directamente después de los riegos regulares de 5 días. De esta manera, el contenido de agua de los sustratos de raíz de las plantas control y tratadas fue aproximadamente el mismo.

Tratamiento 1: 2x tratada con dilución 1.000x de EXTRACTO de PTSO en una solución de alimentación (EC 1.1), suministrada cada dos riegos (intervalo fue 10 días);

Tratamiento 2: 2x tratada con dilución 2.500x de EXTRACTO de PTSO en una solución

de alimentación (EC 1.1), suministrada cada dos riegos (intervalo fue 10 días);

Tratamiento 3: 8x tratada con dilución 1.000x de EXTRACTO de PTSO en una solución de alimentación (EC 1.1), suministrada cada dos riegos (intervalo fue 10 días);

5 Tratamiento 4: 8x tratada con dilución 2.500x de EXTRACTO de PTSO en una solución de alimentación (EC 1.1), suministrada cada dos riegos (intervalo fue 10 días);

Después de los tratamientos, las plantas tratadas se someten al mismo procedimiento de cultivo que las plantas de control, es decir, las plantas no tratadas.

Después de 36 semanas, las plantas se puntuaron en las características como sigue.

10 Las diferencias entre las plantas se expresaron en términos de cantidad de raíces, crecimiento de raíces interrumpido, desarrollo progresivo de hojas, número y longitud de hojas, calidad de planta y corteza (valorado por color y retención de agua, es decir, peso estimado). La evaluación fue como sigue: de las plantas de control, se seleccionaron la planta más grande y la más pequeña. La más grande se calificó con 5, y la más pequeña con 1.

15 Se siguió el mismo procedimiento de puntuación con respecto a la calificación de la formación de raíces: la planta con más raíces se califica con 5, y la que tiene menos raíces se califica con 1.

La longitud de la hoja más grande completamente desarrollada se midió con una cinta métrica.

20 “6-7” hojas significa que 6 hojas ya estaban completamente desarrolladas, y una séptima hoja todavía estaba creciendo.

El “espesor de hoja” se puntuó por la resistencia de la hoja cuando se arqueó a mano.

La “calidad de corteza” se puntuó al juzgar el grado de composición que ha tenido lugar. Cuanto más húmeda y fangosa era la corteza, menor era la puntuación.

El “crecimiento progresivo” es una estimación del grado al cual las hojas de una planta son más grandes que la hoja anterior. En particular, se comparó la última hoja completamente desarrollada con la penúltima hoja desarrollada.

5 “El tamaño de planta se puntuó como sigue: cuanto más grande sea la planta, mayor será la puntuación.

Para las “características de planta”, el enfoque principal se centró en el tamaño de la planta.

10 Las plantas de control se calificaron de 1 a 5 y se compararon con las plantas tratadas. Si cualquiera de las plantas tratadas se había desarrollado mejor con respecto a un criterio de valoración, pueden obtener una puntuación superior a 5. Las plantas con las peores “características de planta” se calificaron como “1”, y las plantas con las mejores características se calificaron 5.

Resultados y análisis

15 Los promedios de las mediciones se resumen en la tabla 2 y se basan en los datos sin procesar. Los datos se recolectaron 36 semanas después de los tratamientos: las plantas acababan de salir de la parte refrigerada del invernadero durante dos semanas para la inducción de flor.

Tabla 2. Promedios calculados de las observaciones.

Grupo de planta	Número de plantas clasificadas	Raíces	Calidad de corteza	Espesor de hoja	Crecimiento progresivo	Número de hojas	Tamaño de hoja (cm)	Tamaño de planta	Características de planta	Observaciones
Control, tratamiento estándar	50	3,42	3,18	3,66	4	6,34 – 7,34	22,1	3,88	1	Brillo débil en las hojas
2x tratada con dilución 1.000x.	50	2,9	2,72	4,82	4,92	6,9 – 7,9	22,6	4,22	2	Brillo fuerte en las hojas

2x tratada con dilución 2.500x	25	3,08	3	5,84	5,64	7,32- 8,32	22,7	5,48	3	Brillo fuerte en las hojas
8x tratada con dilución 1.000x	25	4,2	2,84	5,96	5,72	7,12- 8,12	23,28	5,44	4	Brillo fuerte en las hojas
8x tratada con dilución 2.500x	25	3,6	2,88	4,52	5,72	6,9-7,9	23,7	5,72	5	Brillo fuerte en las hojas

Las plantas que se trataron dos veces con las diluciones 1.000x y 2.500x de EXTRACTO de PTSO mostraron significativamente menos crecimiento de raíces que el control. A pesar de que las raíces de estas plantas tratadas estaban menos desarrolladas que las de las plantas de control, las raíces de las plantas tratadas permiten que la planta crezca
5 más rápido.

Se realizaron observaciones similares, pero más pronunciadas para las plantas que se trataron 8 veces con ambas diluciones: el tamaño de las plantas fue el más grande de todos los tratamientos. Adicionalmente, las raíces mostraron un desarrollo de raíz considerablemente mejor. Además, no solo había más raíces, sino que las raíces tenían tapas
10 de crecimiento más grandes y eran más gruesas. Se concluyó que el mayor efecto en la planta de *Phalaenopsis* fue el tratamiento con la dilución 1.000x que se aplicó 8 veces.

Como se muestra en la tabla 1, también se calificó la calidad de la corteza de sustrato de la raíz. La corteza se descompone lentamente por la actividad microbiana durante el cultivo de plantas. Cuando la corteza se descompone, se convierte en una sustancia anaeróbica
15 húmeda que puede dar por resultado la muerte de las raíces. En tanto que la tabla 1 muestra una calificación ligeramente inferior de la calidad de corteza para las plantas tratadas (2,72-3) en comparación con las plantas de control (3,18), estas diferencias son tan pequeñas que no se esperaban efectos adversos para las plantas tratadas.

Conclusiones

20 Se demostró un efecto muy pronunciado del EXTRACTO de PTSO en las propiedades de planta calificada. Se observó estimulación de crecimiento en comparación con las plantas

de control. Puesto que no hubo hormonas de crecimiento vegetal presentes en el EXTRACTO de PTSO, esta composición pertenece a la categoría de bioestimulantes. Durante el período de prueba estaba claro que las plantas no eran capaces de crecer a la velocidad máxima de crecimiento durante los experimentos que dieron por resultado estrés abiótico (hubo períodos de sequía, calor y mucha luz). En los experimentos se mostró que el EXTRACTO DE PTSO es capaz de compensar el estrés abiótico. Las condiciones de fertilización fueron exactamente las mismas para todas las plantas, pero se formó más biomasa vegetal junto con características mejoradas de planta en las plantas tratadas con EXTRACTO de PTSO. Esto indica que la eficiencia de uso de nutrientes fue mayor para las plantas tratadas con EXTRACTO de PTSO.

Otra observación interesante fue que las plantas tuvieron un brillo muy claro en las hojas. Esto se atribuyó a la formación de una capa más gruesa de cera en la hoja y se considera como una indicación de una mejor salud de plantas. Sin desear que se limite por teoría, se cree que una capa espesa de cera habitualmente disminuye la evaporación de agua de la superficie superior de hoja, que contribuyó a la disminución en el estrés abiótico.

Las observaciones realizadas después de los tratamientos en *Phalaenopsis* en los cuales se aplicó EXTRACTO de PTSO dos veces, han mostrado que esto fue suficiente para inducir un efecto a largo plazo durante un tiempo de cultivo de más de 6 meses, lo cual fue muy sorprendente.

La floración de las plantas no se afectó por los tratamientos y las plantas representaron un excelente producto comercial. No se han observado desviaciones en términos de marchitamiento, flores anormales, forma o tamaño de tallo.

En este ejemplo se muestra claramente que el EXTRACTO de PTSO es un potente bioestimulante.

Ejemplo 2b. Tratamiento de plantas de *Phalaenopsis*

Alcance: en este ejemplo se demostró el efecto bioestimulante del EXTRACTO de PTSO sobre la supervivencia después del trasplante y la producción de tallos de flores durante la trayectoria de cultivo. Para este propósito, se seleccionaron diferentes híbridos de

Phalaenopsis. El crecimiento y desarrollo de las plantas abarca tres etapas: (1) crecimiento vegetativo, (2) inducción de flores y (3) desarrollo de tallos de flores. Se siguió el mismo régimen de crecimiento como se describe en el ejemplo 2. Después de los tratamientos como se menciona más adelante, las plantas se evaluaron en la falla después del trasplante y el número de tallos de flores al final del ciclo de cultivo.

Alcance: durante el crecimiento de *Phalaenopsis*, el agricultor se enfrenta regularmente a pérdidas significativas después del trasplante. Esto puede contar hasta 10 % dependiendo del tamaño, condición y antecedentes genéticos del híbrido. En este ejemplo se demostró que el EXTRACTO de PTSO disminuye fuertemente la falla de las plantas (jóvenes) de *Phalaenopsis* después del trasplante e incrementa el número de tallos de flores antes de la venta de las plantas. Para este propósito, se cultivaron diferentes híbridos de *Phalaenopsis* a partir de meristemas y se cultivaron previamente en bandejas de 70 orificios hasta un diámetro de 5 cm con Floricultura. En lo sucesivo, las plantas se entregaron en el agricultor y se trasplantaron de bandejas de 70 orificios a bandejas de 45 orificios con tapones de guisante/coco como sustrato (Xcellent Plug Quick plug B.V., Monster, Países Bajos).

El trasplante de una planta se considera un período estresante. Es inevitable que las raíces se dañen y directamente después de trasplantar el sustrato de la raíz (corteza) frecuentemente no tiene las propiedades óptimas en términos de hidratación y capilaridad. Las plantas experimentan esto como sequía, una especie de estrés abiótico.

Después del trasplante, las plantas se trataron con EXTRACTO de PTSO diluido 2500x semanalmente (800 ml/ha). Después de 26 semanas después del trasplante, se verificaron 13.000 plantas en falla (= muerte completa) y se compararon con 13.000 plantas no tratadas. Los resultados se presentan en la tabla 2a.

Tabla 2a. Falla de algunos híbridos de *Phalaenopsis* de plantas no tratadas y tratadas.

Falla significa: morir por completo.

Híbrido de <i>Phalaenopsis</i>	Tratamiento	% de falla
Joyride	Tratada	4,8
	Ninguno	17,9
Angle Eyes	Ninguno	4,1

	Tratada	3,8
Coco 4	Ninguno	3,2
	Tratada	2,8
Donau	Ninguno	6,7
	Tratada	2,6
Gold Baby	Ninguno	7,1
	Tratada	4,5
LaPaz	Ninguno	12,6
	Tratada	5,3
Lumion	Ninguno	3,1
	Tratada	1,7
Murcia	Ninguno	4,8
	Tratada	2,0
Prince	Ninguno	6,6
	Tratada	0,5
Serena	Ninguno	7,9
	Tratada	7,1

A partir de estos resultados, está claro que el tratamiento con Extracto de PTSO tiene un fuerte efecto positivo sobre la supervivencia después de un trasplante que se puede considerar como un manejo estresante.

Después de 26 semanas, las plantas se colocaron en macetas transparentes de 12 cm y se cultivaron en el mismo régimen de cultivo como se indica en el ejemplo 2.

Los híbridos Mekong, Orinoco, Ferrara y Goya se evaluaron en el crecimiento como se indica en el ejemplo 2, y con todos estos híbridos se observó estimulación de crecimiento (los datos sin procesar no se muestran aquí).

Después de la inducción de tallo de flor en una habitación refrigerada, se cuenta el número de tallos de flores por planta. Para ese propósito, se evaluaron 800 plantas por híbrido (ver tabla 2b).

Tabla 2b. Número promedio de tallos de flores de plantas tratadas y no tratadas de

diferentes híbridos de *Phalaenopsis* después de la inducción de floración.

Híbrido de <i>Phalaenopsis</i>	Tratamiento	Número promedio de tallos de flores por planta
Ferrara	Ninguno	1,7
	Tratada	2,0
Mekong	Ninguno	2,5
	Tratada	2,7
Narbonne	Ninguno	2,0
	Tratada	2,7

A partir de la tabla 2b, está claro que el número de tallos de flores formados es mayor después del tratamiento que el grupo de control cuando se cultiva bajo las mismas condiciones. Esto hace que el Extracto de PTSO sea un bioestimulante.

5 Ejemplo 3. Tratamiento de esquejes de *Chrysanthemum*

El EXTRACTO de PTSO se probó en la actividad bioestimulante como se define en el Reglamento 2019/1009 de la UE. Los resultados se verificaron para la aparición de las 4 propiedades mencionadas sobre el enraizamiento y crecimiento de esquejes de *Chrysanthemum*. Los experimentos fueron realizados por una institución de investigación independiente, Vertify. Países Bajos.

Alcance: en este ejemplo se demostró el efecto del EXTRACTO de PTSO como un bioestimulante. Para este propósito, se seleccionaron esquejes de la variedad de *Chrysanthemum* “Chic”. Los esquejes de *Chrysanthemum* se plantaron en tierra de maceta estándar fertilizada en un recipiente de planta plano (una “parcela”). Cada parcela consistió en 30 plantas).

Con todos los tratamientos, se realizaron tres tratamientos repetidos en las raíces como se indica más adelante con un intervalo de 1 semana. La temperatura, control de luz y humedad relativa en el compartimiento de invernadero se registraron con una computadora climática (Sercom).

Después de los tratamientos, las plantas se evaluaron al final del período de inducción de flores. La última valoración se realizó 13 días después del último tratamiento. Los esquejes se evaluaron en función de la formación de raíces, longitud de los tallos y la condición total de la planta.

5 Procedimiento de cultivo de plantas

Los esquejes de *Chrysanthemum* “Chic” enraizados con la misma longitud fueron entregados por Royal van Zanten, Países Bajos.

El ensayo se realizó bajo condiciones controladas en instalaciones de invernadero. Las cajas de 40x60 cm y 10 cm de profundidad se llenaron con tierra de maceta estándar fertilizada (medio orgánico) en la cual se plantaron los esquejes de *Chrysanthemum*. Cada parcela consistió en 2 cajas con 15 plantas cada una (30 plantas por parcela).

Los tratamientos (una dilución específica) existieron de tres aplicaciones con intervalos de 1 semana, la primera aplicación se realizó 1 semana antes del trasplante (fase de enraizamiento), una segunda aplicación se realizó en el trasplante. Se realizó una aplicación final 1 semana después del trasplante. La aleatorización de los tratamientos tiene lugar en el invernadero de prueba, y el lugar donde se colocan las plantas se determina usando el software Genstat. El análisis estadístico de los resultados de ensayo se realiza con el mismo software. Los detalles se dan en la sección de resultados de este ejemplo.

La temperatura y humedad relativa en el compartimiento de invernadero se registraron con la computadora climática y se establecieron en 23 °C y 50 % respectivamente.

Las aplicaciones que se dirigen a las raíces se realizaron como empapamiento o aspersión. La primera aplicación en las raíces se realizó al empapar las plantas en las soluciones durante aprox. 15 minutos. Las parcelas no tratadas se empaparon en agua. Los esquejes se mantuvieron en cajas con sus raíces en una capa de agua hasta trasplantarlos en cajas con tierra. Se realizaron otras aplicaciones al rociar las soluciones sobre el suelo, seguido de una suave lluvia para incorporar los productos en la zona de enraizamiento. Los detalles de solicitud y valoración se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Programa de tiempo experimental.

Manejos	Datos (DA: Días después)
Plantación	Día 7
Fechas de aplicación	Día 0 (A) Día 7 (B) Día 13 (C)
Fechas de valoración	Día 7 (en el trasplante; 0 DA-B)* Día 13 (0 DA-C) Día 19 (6 DA-C) Día 26 (13 DA-C)

DA: Días después.

Los tratamientos se resumen en la Tabla 4. Previcur Energy es un fungicida y Trianum-P es un fungicida biológico.

5 Tabla 4. Lista de tratamientos.

Número experimental	Tratamiento
1	Sin tratar
2	Previcur Energy (1 L/ha)
3	Trianum-P (2,5 kg/ha)
4	EXTRACTO DE PTSO; dilución 1:1.000
5	EXTRACTO DE PTSO tasa de dilución 1:2.500
6	EXTRACTO DE PTSO; tasa de dilución 1:5.000
7	EXTRACTO DE PTSO; tasa de dilución 1:10.000
8	EXTRACTO DE PTSO; tasa de dilución 1:50.000

En cada fecha de valoración, se midió la altura de 10 plantas centrales por parcela. Se realizaron valoraciones adicionales sobre el vigor general de cultivos. El vigor general de cultivos se registró en la escala de índice 1-10 (1= vigor muy bajo de cultivos; 10= vigor excelente (por arriba de lo normal) de cultivos) y se basa en la impresión de la salud general.

10 En la última fecha de valoración, se midió el peso fresco de la masa vegetal sobre el suelo. Se registró la densidad de enraizamiento en el lado inferior de las cajas. Para este propósito,

se voltearon las cajas y se estimó el porcentaje de raíces que cubre la parte inferior del fondo.

El análisis estadístico se realizó con Genstat (prueba de LSD a 95 %). En la tabla, P significa probabilidad. Cuando P tiene un valor de 0,05 o menos, la diferencia entre dos tratamientos es estadísticamente significativa. La diferencia menos significativa (lsd) es la diferencia más pequeña entre diferentes tratamientos significativos a 95 % (P = 0,05). Los valores indicados con la misma letra no difieren significativamente (P = 0,05).

Se disolvió 1 litro de EXTRACTO de PTSO en 1.000 litros de agua (tasa de dilución 1:1.000) y este volumen de 1.001 litros se roció sobre el suelo con una superficie de 1 ha).

Resultados

Los resultados después del análisis de la altura de cultivo se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Desarrollo de la altura de cultivo con los diferentes tratamientos como una función del tiempo. Las columnas con la altura de cultivo indican los grupos estadísticos después del análisis estadístico de LSD.

Tratamiento	Aplicación	Altura de cultivo (cm)			
		0 DA-B	0 DA-C	6 DA-C	13 DA-C
1 Sin tratar	-	12,9 b	18,5 bc	29,8 bc	51,5 bc
2 Previcur Energy (1 L/ha)	Suelo	15,0 e	20,3 e	31,6 e	54,8 d
3 Triatum-P (2,5 kg/ha)	Suelo	13,0 b	18,1 b	29,2 b	50,8 b
4 EXTRACTO DE PTSO; tasa 1:1.000 (1 L/ha)	Suelo	11,8 a	16,0 a	26,8 a	48,7 a
5 EXTRACTO DE PTSO; tasa 1:2,500 (0,4 L/ha)	Suelo	13,6 bc	18,9 c	30,3 bcd	52,4 bc

6	EXTRACTO DE PTSO; tasa 1:5.000 (0,2 L/ha)	Suelo	13,9	c	19,0	cd	30,4	cde	52,0	bc
7	EXTRACTO DE PTSO; tasa 1:10.000 (0,1 L/ha)	Suelo	14,7	de	19,7	de	31,1	de	53,2	cd
8	EXTRACTO DE PTSO; tasa 1:50.000 (0,02 L/ha)	Suelo	14,0	cd	19,0	cd	30,2	bcd	53,4	cd
P			<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
LSD			0,7		0,8		1,2		2,0	

Con EXTRACTO de PTSO a la concentración más alta (1:1000), en el trasplante 0 DA-B, las plantas fueron significativamente más cortas en comparación con todos los demás tratamientos. A una concentración de 1:2.500, no se encontró ningún efecto adverso del tratamiento de inmersión en la altura de cultivo.

- 5 Después de repetidas aplicaciones y durante el período de prueba, las diferencias permanecieron visibles. Se construyó una respuesta de dosis con EXTRACTO DE PTSO. Las plantas más altas se midieron a concentraciones 1:10.000 y 1:50.000.

- 10 El vigor general de cultivos se registró en la escala de índice 1-10 (1= vigor muy bajo de cultivos; 10= vigor excelente (por arriba de lo normal) de cultivos). El vigor de cultivo es una medición subjetiva del color y forma de planta. Los resultados se resumen en la tabla 6.

Tabla 6: Vigor de cultivos.

Tratamiento		Aplicación	Vigor (escala 1-10 ¹)		
			0 DA-C	6 DA-C	13 DA-C
1	Sin tratar	-	7,2	7,4	7,4
2	Previcur Energy (1 L/ha)	Suelo	7,4	7,7	7,9
3	Triunum-P (2,5 kg/ha)	Suelo	6,9	7,1	7,5
4	EXTRACTO DE PTSO; Tasa 1:1.000 (1 L/ha)	Suelo	4,9	5,2	6,1
5	EXTRACTO DE PTSO; Tasa 1:2.500	Suelo	7,0	7,7	7,9

6	EXTRACTO DE PTSO; Tasa 1:5.000	Suelo	7,0	7,4	7,6
7	EXTRACTO DE PTSO; tasa 1:10.000	Suelo	7,9	7,8	7,8
8	EXTRACTO DE PTSO; tasa 1:50.000	Suelo	7,0	7,4	7,4

¹ 1= vigor muy bajo de cultivos; 10= vigor excelente (por arriba de lo normal) de cultivos.

En el vigor general de cultivos, solo el EXTRACTO de PTSO a una concentración de 1:1.000 tuvo un rendimiento menor en comparación con todos los demás tratamientos. En la última fecha de valoración (19 días después del trasplante), se midió el peso fresco de la masa vegetal sobre el suelo. Se registró la densidad de enraizamiento en el lado inferior de las cajas. Los resultados se resumen en la tabla 7.

Tabla 7: Peso fresco y enraizamiento (aplicaciones en suelo).

Tratamiento		Aplicación	19 días después del trasplante	
			Peso fresco (g/parcela)	Densidad de enraizamiento (%)
1	Sin tratar	-	1097,8	36,0
2	Previcur Energy (1 L/ha)	Suelo	1161,2	36,0
3	Triatum-P (2,5 kg/ha)	Suelo	1124,6	39,0
4	EXTRACTO DE PTSO; Tasa 1:1.000 (1 L/ha)	Suelo	1018,0	46,0
5	EXTRACTO DE PTSO; Tasa 1:2.500	Suelo	1123,8	44,0
6	EXTRACTO DE PTSO; Tasa 1:5.000	Suelo	1137,4	42,0
7	EXTRACTO DE PTSO; Tasa 1:10.000	Suelo	1131,6	36,0
8	EXTRACTO DE PTSO; Tasa 1:50.000	Suelo	1140,0	40,0
P			0,004	

El peso fresco de la masa vegetal sobre el suelo de las plantas tratadas con EXTRACTO de PTSO a una concentración de 1:1000, aplicado como tratamiento del suelo, fue menor en comparación con los otros tratamientos. Aunque el enraizamiento en el trasplante parecía estar afectado, los resultados finales obtenidos 19 días después del trasplante no mostraron efectos adversos sobre el enraizamiento. Con este tratamiento, la

densidad de enraizamiento fue aún mayor en comparación con los otros tratamientos. Después de todos los tratamientos del suelo con EXTRACTO de PTSO, la densidad de enraizamiento fue igual (entrada 7 en la tabla 7) o incluso mayor (entradas 4-6 y 8 en la tabla 7) en comparación con las parcelas no tratadas y también ambas referencias Previcur Energy y Trianum-P.

Después de la primera aplicación durante la fase de enraizamiento (empapado) con EXTRACTO de PTSO a la concentración más alta (1:1000), apenas se observaron raíces. Las plantas también fueron más cortas en comparación con las parcelas no tratadas. También a una concentración de 1:2.500 de EXTRACTO de PTSO se observaron menos raíces en comparación con las plantas no tratadas y de referencia Previcur Energy y Trianum-P.

Después de repetidas aplicaciones y durante el período de ensayo, después de las aplicaciones en el suelo, se observó una relación dosis-respuesta para los tratamientos con EXTRACTO de PTSO. Las plantas más altas se midieron a las concentraciones más bajas de EXTRACTO de PTSO, a saber, 1:10.000 y 1:50.000. A estas concentraciones, las plantas fueron significativamente más altas en comparación con las plantas no tratadas hasta 2 semanas después de la siembra. Cuando se sometieron a la concentración más alta de EXTRACTO de PTSO, a saber, 1:1.000, las plantas fueron más pequeñas en comparación con todos los demás tratamientos. Las diferencias también se reflejaron en el peso fresco en la última fecha de valoración (19 días después del trasplante).

Aunque durante los tratamientos con EXTRACTO de PTSO a una concentración de 1:1000, el enraizamiento durante la fase de enraizamiento (empapado) se afectó y las plantas fueron más pequeñas en comparación con aquellas sometidas a otros tratamientos, no se encontraron efectos adversos en el enraizamiento final. Después del tratamiento con EXTRACTO de PTSO a una concentración de 1:1000, el enraizamiento a 19 días después del trasplante fue numéricamente aún mejor en comparación con los otros tratamientos.

con las otras concentraciones probadas. Además, el EXTRACTO de PTSO cuando se aplicó como tratamiento de suelo dio por resultado un enraizamiento numéricamente mejor en comparación con las parcelas no tratadas y también ambas referencias Previcur Energy y Trianum-P.

El *Chrysanthemum* es una flor cortada que se produce en grandes cantidades y se vende al por menor por peso. En este ejemplo se demuestra claramente que estas composiciones dan por resultado más peso y por lo tanto, son beneficiosas para el horticultor.

5 A partir de estos experimentos también queda claro que se deben dosificar las dosis correctas de este bioestimulante a fin de obtener los efectos bioestimulantes.

Ejemplo 4. Tratamiento de semillas y plántulas de lechuga

Las semillas de la variedad de lechuga (*Lactuca sativa*) “volare” se obtuvieron de Enza Zaden, y Trianum P de Bayer AG, Crop Science Division.

10 Las cajas de siembra (45 con 30 cm, 8 cm de profundidad, 9 litros de tierra/caja de siembra) se llenaron con tierra de siembra estándar (sustratos BVB) que consistía en medio orgánico fino en el cual se sembró la lechuga. El suelo de siembra obtenido se fertilizó por el productor, no se realizó fertilización adicional durante el experimento. Cada parcela consistió en 1 caja de siembra con 50 semillas y plantadas a una profundidad de 2 cm.

Las semillas se trataron cerca antes de la siembra como se indica en la tabla 8.

15 Tabla 8: Lista de tratamientos.

No.	Tratamiento, empapado en:
1	Sin tratar
2	Vigor Seed; 10 g/hL
3	PE; 1:5.000* (aproximadamente 112 mg PTSO/L)
4	PE; 1:10.000* (aproximadamente 56 mg de PTSO/L)
5	PE; 1:25.000* (aproximadamente 22 mg de PTSO/L)
6	PE; 1:50.000* (aproximadamente 11 mg de PTSO/L)

* Tasa de dilución

PE = Extracto de PTSO

Las soluciones con EXTRACTO de PTSO se prepararon con agua de grifo. Las aplicaciones se realizaron al empapar las semillas en las soluciones preparadas durante 10 minutos. Después de empapar las semillas se secaron al aire y se sembraron. Las semillas no tratadas se empaparon en agua. “Vigor Seed” se usó como un agente de referencia. Las cajas se cubrieron con una tapa hasta la germinación. La temperatura se estableció en 21 °C, una humedad del aire varió entre 70 – 95 %. La exposición a la luz se realizó por tres tubos LED de 25 vatios a 30 cm de distancia de las plantas (50 μ mol). Después de la germinación, se removió la tapa.

La aleatorización de los tratamientos se realizó manualmente. El análisis estadístico de los resultados de ensayo se realiza con el software Genstat. La temperatura, control de luz y humedad relativa en el clima se controlaron y registraron con una computadora climática (Sercom).

Los detalles del ensayo se resumen en la tabla 9.

Tabla 9: Detalles de ensayo.

Ubicación:	Países Bajos
Cultivo:	Lechuga
Variedad:	Volare
TSW *	1,446 g
Lote de semillas	6034072
Fecha de siembra	Día 0
Fechas de valoración	Día 4 (4 DA-S**; en la germinación) Día 7 (7 DA-S) Día 12 (12 DA-S) Día 21 (21 DA-S) Día 28 (28 DA-S)

*TSW: Peso de mil semillas

** DA-S: Días después de siembra.

Cuando todas las semillas habían germinado completamente, las plantas se puntuaron

como normales, pequeñas o anormales (plantas con cotiledones u hojas malformadas), el vigor general de cultivos se registró en la escala de índice 1-10. En la última fecha de valoración (4 semanas después de plantar las semillas), se midió el peso fresco de la masa vegetal sobre el suelo.

5 En cada fecha de valoración, se contó el número de plantas germinadas por parcela. Después de la germinación completa, las plantas se puntuaron como normales, pequeñas o anormales (plantas con cotiledones u hojas malformadas). Adicionalmente, el vigor general de cultivos se registró en la escala de índice 1-10 (1= vigor muy bajo de cultivos; 10= vigor excelente (por arriba de lo normal) de cultivos). En la última fecha de valoración, se midió el
10 peso fresco de la masa vegetal sobre el suelo. El análisis estadístico se realizó con Genstat (prueba de LSD a 95 %). En la tabla, P significa probabilidad. Cuando P tiene un valor de 0,05 o menos, la diferencia entre dos tratamientos es estadísticamente significativa. La diferencia menos significativa (lsd) es la diferencia más pequeña entre diferentes tratamientos significativos a 95 % (P = 0,05). Las cifras con la misma letra no difieren significativamente (P
15 = 0,05). Por ejemplo, en los tratamientos a 12 DA-S, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las plantas no tratadas ("a") y Vigor Seed ("a"), PE; 1:50.000 ("a") o PE; 1:25.000 ("ab"); pero se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas no tratadas ("a") y PE; 1:10.000 ("bc") y PE; 1:5.000 ("c"). De manera similar, el tratamiento PE; 1:5.000 ("c") difiere significativamente de todos los demás
20 tratamientos excepto PE; 1:10.000 ("bc").

Resultados y análisis

En cada fecha de valoración, se contó el número de plantas germinadas por parcela.

Cuando todas las plantas habían germinado completamente, las plantas se clasificaron en las categorías normales, pequeñas o anormales (las plantas anormales tienen cotiledones
25 u hojas malformadas).

Los resultados se resumen en las tablas 10 y 11.

Tabla 10: Plantas germinadas.

Tratamiento	No. de plantas germinadas por parcela (50 plantas por parcela)				
	4 DA-S ¹	7 DA-S ¹	12 DA-S ¹	21 DA-S ¹	28 DA-S ¹
1 Sin tratar	47,3 a	49,3 a	44,8 a	44,5 a	44,5 a
2 Vigor Seed; 10 g/hL	45,0 a	49,3 a	45,3 a	45,3 a	45,3 a
3 PE; 1:5.000	48,0 a	50,0 a	49,5 c	49,5 c	49,5 c
4 PE; 1:10.000	45,3 a	49,3 a	48,8 bc	48,8 bc	48,8 bc
5 PE; 1:25.000	46,0 a	48,5 a	46,8 ab	46,5 ab	46,5 ab
6 PE; 1:50.000	46,3 a	49,0 a	45,0 a	45,0 a	44,8 a
P	0,609	0,451	0,002	0,003	0,002
LSD	4,1	1,5	2,5	2,5	2,5

¹ DA-S = Días después de siembra.

Tabla 11: Plantas normales (germinadas-pequeñas-anormales).

Tratamiento	No. de plantas normales por parcela (50 plantas por parcela)				
	4 DA-S*	7 DA-S	12 DA-S	21 DA-S	28 DA-S
1 Sin tratar	47,3 a	48,5 a	43,8 a	44,3 a	44,0 a
2 Vigor Seed; 10 g/hL	45,0 a	47,5 a	45,0 ab	45,3 a	44,8 a
3 PE; 1:5.000	48,0 a	49,0 a	48,8 c	49,0 b	49,0 b
4 PE; 1:10.000	45,3 a	47,5 a	47,5 bc	48,3 b	48,3 b
5 PE; 1:25.000	46,0 a	47,8 a	46,0 abc	46,3 ab	46,3 ab
6 PE; 1:50.000	46,3 a	48,3 a	44,5 ab	45,0 a	44,8 a
P	0,609	0,681	0,025	0,012	0,008
LSD	4,1	2,3	3,0	2,8	2,8

* DA-S = Días después de siembra.

Solo se encontraron algunas diferencias menores entre el número de plantas germinadas y el número de plantas normales, que indica que solo se encontraron pocas plantas pequeñas o anormales.

Durante la germinación y en la germinación completa, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos tanto en el número de plantas germinadas como en el número de plantas normales. El nivel de germinación con todos los tratamientos fue muy bueno. Los tratamientos no afectaron la germinación ni la calidad de las plántulas, ya sea positiva o negativa.

A los 12 días después de la siembra y las fechas de valoración posteriores, se encontró caída de las plantas, específicamente en las concentraciones de PE no tratadas, de vigor seed y más bajas. No se encontró ninguna explicación: no se detectaron patógenos de plantas u otras placas.

- 5 Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Se construyó una respuesta de dosis con PE. Con PE a la concentración más alta (1:5.000), no se encontró caída de las plantas. A la concentración más baja (1:50.000), PE fue comparable a las parcelas no tratadas.

- 10 Con las diluciones más bajas de PE (es decir, PE a las concentraciones más altas), cuando se aplicaron como aplicación empapada en semillas, las plántulas fueron más resistentes en comparación con las plántulas de semillas no tratadas. Los efectos significativos se midieron a concentraciones 1:5.000 y 1:10.000. Con Vigor Seed, no se observaron efectos con las parcelas no tratadas.

- 15 El vigor general de cultivos se registró en la escala de índice 1-10 (1= muy bajo; 10= excelente (por arriba de lo normal). El vigor del cultivo es una estimación de las plantas, en este caso el color y forma (tabla 12).

Tabla 12: Estimación del vigor de cultivo con las diferentes diluciones de PE.

Tratamiento	Vigor (escala 1-10)				
	4 DA-S*	7 DA-S	12 DA-S	21 DA-S	28 DA-S
1 Sin tratar	n.d.	7,9	7,6	7,6	8,0
2 Vigor Seed; 10 g/hL	n.d.	7,8	7,8	7,6	7,9
3 PE; 1:5.000	n.d.	8,0	8,0	8,6	8,8
4 PE; 1:10.000	n.d.	8,1	8,0	8,5	8,5
5 PE; 1:25.000	n.d.	8,0	7,8	8,1	7,9
6 PE; 1:50.000	n.d.	7,9	7,8	8,1	8,1

* DA-S = Días después de siembra.

- 20 A una tasa de dilución de 1:5.000 y 1:10.000 dio por resultado algunas plantas con mejor vigor en comparación con una concentración más baja, Vigor Seed y las parcelas no tratadas.

En la última fecha de valoración (28 días después de la siembra; 24 días después de la germinación), se midió el peso fresco de la masa vegetal sobre el suelo. Los resultados se resumen en la tabla 13.

Tabla 13: Peso fresco de las diferentes parcelas.

	Tratamiento	Peso fresco (g/parcela)
1	Sin tratar	217,5
2	Vigor Seed; 10 g/hL	190,4
3	PE; 1:5.000	240,9
4	PE; 1:10.000	242,4
5	PE; 1:25.000	220,2
6	PE; 1:50.000	231,4

- 5 Todos los tratamientos con diluciones de EXTRACTO de PTSO conducen a un incremento en el peso fresco sobre el control. En conclusión, el nivel de germinación con todos los tratamientos fue muy bueno. Los tratamientos no habían afectado negativamente la germinación ni la calidad inicial de las plántulas. Las plántulas que germinaron a partir de semillas tratadas con PE 1:5.000 y 1:10.000 fueron significativamente más resistentes en
- 10 comparación con las plántulas de semillas no tratadas y Vigor Seed. Se encontró menos caída de las plantas ($\pm 1\%$ versus $\pm 10\%$ sin tratar), en tanto que también el vigor de cultivos fue mejor en comparación con las parcelas sin tratar. También, el peso del cultivo medido 28 días después de la siembra fue mayor cuando se trató con PE 1:5.000 y 1:10.000 y dio por resultado 11 % más de peso del cultivo en comparación con el no tratado y 26 % más que el
- 15 punto de referencia Vigor Seed. El tamaño de la planta fue 4 a 6 hojas maduras en ese momento.

Con el agente de referencia Vigor Seed, no se midieron efectos en comparación con las parcelas no tratadas.

Conclusión

- 20 El presente ejemplo demuestra que el uso de EXTRACTO de PTSO conduce a cabezas más grandes de lechuga y mayor rendimiento por entrada de nutrientes (es decir, un marcador de eficiencia de utilización de nutrientes), así como vigor de cultivo incrementado, proporcionando evidencia adicional del efecto bioestimulante de los compuestos divulgados

en la presente.

Ejemplo 5. Tratamiento de plantas de tomate

Alcance: en este ejemplo se demostró el efecto bioestimulante y la forma de administración del EXTRACTO de PTSO (PE). Para este propósito, se seleccionó la raza de
5 producción de tomate comercial “Xandor”.

Procedimiento de cultivo de plantas

Se usó la raza de tomate “Xandor”, de Axia Seeds, Países Bajos. Las plantas de tomate se cultivaron previamente a un tamaño de 60 cm.

Las plantas de tomate de la raza “Xandor” se precultivaron y las plantas se colocaron
10 en esteras de lana de roca (Grodan (ROCKWOOL B.V.) en un invernadero en primavera. Las plantas se alimentaron y se ajustaron en línea dependiendo de la evaporación real y el clima or un sistema de computadora entregado por Priva B.V. Todos los nutrientes en la alimentación de planta se suministraron en exceso y la composición se muestreó semanalmente y se verificaron las limitaciones de nutrientes. El valor de EC se mantuvo entre
15 2,3 – 3,0 y el pH se mantuvo a 5,4 y se corrigió continuamente. En la tabla 14 se presentan los parámetros de crecimiento que se ajustaron, monitorearon y controlaron. La tabla 14 indica las configuraciones, pero los valores reales varían considerablemente debido a los cambios variables en las condiciones climáticas durante el día.

Tabla 14

Parámetro de crecimiento	configuración
Temperatura diurna	20 °C
Temperatura nocturna	16-18 °C
Humedad relativa del aire	70 %
Exposición a la luz	Luz diurna
Luz artificial	ninguno
Drenaje de alimentación	15-25%

Tabla 15. Programa de tiempo experimental.

Manejos	Datos (DA: Días después)
Plantación	Primavera temprana; Día 0
Fechas de aplicación	T1: Día 85 T2: Día 91 T3: Día 98 T4: Día 105 T5: Día 112 T6: Día 119 T7: Día 12 T8: Día 133 T9: Día 141 T10: Día 147
Fechas de valoración	La valoración de la cosecha se realizó semanalmente. La puntuación de cultivo se realizó 5 veces, específicamente: Día 124 Día 131 Día 142 Día 152 Día 176

Los tratamientos se resumen en la Tabla 16. Serenade es un fungicida que frecuentemente se aplica en cultivos de tomate.

Tabla 16. Lista de tratamientos.

Número experimental	Tratamiento
1	Sin tratar
2	EXTRACTO DE PTSO; dilución 1:10.000, rociar sobre la hoja
3	EXTRACTO DE PTSO tasa de dilución 1:25.000, rociar sobre la hoja
4	EXTRACTO DE PTSO; tasa de dilución 1:50.000, rociar sobre la hoja
5	Serenade (2,8 ml/l)
6	EXTRACTO DE PTSO; dilución 1:10.000, vertido en estera

7	EXTRACTO DE PTSO tasa de dilución 1:25.000, vertido en estera
8	EXTRACTO DE PTSO; tasa de dilución 1:50.000, vertido en estera

Cada tratamiento consiste en un grupo de 13 plantas.

Los volúmenes de aspersión aplicados fueron 150 ml/m² cada vez, en caso de administrar en la estera se dosificaron 100 ml/planta. Se realizaron valoraciones adicionales sobre el vigor general de cultivos. El vigor general de cultivos se registró en la escala de índice 1-10 (1= vigor muy bajo de cultivos; 10= vigor excelente (por arriba de lo normal) de cultivos) y se basa en la impresión de la salud general. Los criterios de vigor de cultivo fueron “la condición general de las plantas (frescura de la planta, firmeza de las hojas, hojas sanas)” “calidad de cabeza del tomate” (diámetro de la cabeza, espesor del tallo y se calificaron de 1 (muy pobre) a 10 (excelente) y color de las hojas (calificado de 1 (amarillo) – 5 verde). Además, una vez por semana se cosecharon y midieron los tomates maduros.

El análisis estadístico se realizó con Genstat (prueba de LSD a 95 %). En la tabla, P significa probabilidad. Cuando P tiene un valor de 0,05 o menos, la diferencia entre dos tratamientos es estadísticamente significativa. La diferencia menos significativa (lsd) es la diferencia más pequeña entre diferentes tratamientos significativos a 95 % (P = 0,05). Los valores indicados con la misma letra no difieren significativamente (P = 0,05).

Después de plantar en las esteras, el desarrollo del cultivo tuvo lugar como se esperaba para esta raza. El día 124 se iniciaron las valoraciones. Los resultados se presentan en las tablas 17-20.

La tabla 17 demuestra que el EXTRACT de PTSO no tiene un efecto negativo sobre la producción acumulada de tomate y a una dilución de 1:10.000 incrementó ligeramente la producción acumulada de tomate. Se calificaron varios parámetros de calidad de planta, incluida la calidad de cabeza de tomate (tabla 18), la condición de salud de planta (tabla 19) y color de cultivo (tabla 20). Todas las diluciones del EXTRACT de PTSO mostraron calidad mejorada con respecto a las cabezas de tomate, condición de planta y color de planta.

Las condiciones de fertilización fueron las mismas para todas las plantas, pero se formó más biomasa vegetal junto con características mejoradas de planta en las plantas

tratadas con EXTRACTO de PTISO. Esto indica que la eficiencia de uso de nutrientes fue mayor para las plantas tratadas con EXTRACTO de PTISO. Las observaciones realizadas después de los tratamientos en plantas de tomate en las cuales se aplicó EXTRACTO de PTISO en las primeras 4 semanas de cultivo de tomate, han mostrado que esto fue suficiente para inducir un efecto positivo durante el tiempo de cultivo de más de 6 meses, lo cual fue muy sorprendente.

No se han observado desviaciones en términos de marchitamiento, brote de flores y/o caída de flores, fruta anormal, forma o tamaño de tallo u hoja.

A pesar de que todos los tratamientos mostraron una mejora de los parámetros de calidad de cultivo, se encontró que solo un método de administración fue efectivo para incrementar la cosecha, específicamente, tratamientos repetidos por goteo con un EXTRACTO de PTISO diluido 25.000 x: esto dio por resultado un incremento acumulado de la producción de tomate de 8 %

En este ejemplo se muestra claramente que el EXTRACTO de PTISO es un potente bioestimulante, en particular cuando se administra más de una vez por el agua de riego. Tabla 17. La producción acumulada de tomate en kilogramos se indica el día indicado después de la siembra.

Día	121	128	135	142	149	156	163	170	177
Sin tratar	1,1	2,2	4,0	5,8	7,0	7,5	9,8	10,7	11,5
PE; 1:10000 aspersión	0,9	1,8	3,8	5,5	7,1	8,0	9,9	11,0	11,3
PE; 1:25000 aspersión	0,9	2,1	4,2	5,9	7,0	7,8	10,2	10,9	11,4
PE; 1:50000 aspersión	1,1	2,1	4,0	5,6	7,2	7,9	10,0	10,7	11,2
Serenade	0,9	1,8	3,9	5,5	6,9	7,7	9,7	10,6	11,0
PE; 1:10000 goteo	1,0	2,2	4,3	6,0	6,9	7,9	10,1	10,9	11,3
PE; 1:25000 goteo	0,9	2,0	3,6	5,5	7,0	7,7	10,7	11,8	12,4
PE; 1:50000 goteo	1,0	1,9	4,1	5,9	7,1	8,2	9,8	10,9	11,4

Tabla 18. La calidad de cabeza de tomate se indica el día indicado después de la siembra.

Día	124	131	142	152
-----	-----	-----	-----	-----

Sin tratar	3,3	3,5	6	6,5
PE; 1:10000 aspersión	4,5	4,3	7,3	7
PE; 1:25000 aspersión	4,8	4,3	6	7
PE; 1:50000 aspersión	5	4	6,5	7
Serenade	4	4	7	7
PE; 1:10000 goteo	4,5	4,3	7	7,3
PE; 1:25000 goteo	3,5	4,8	7	7,5
PE; 1:50000 goteo	4,8	3,3	7	7

Tabla 19. La calificación de la condición de planta se indica el día después de la siembra.

Día	124	131	142	152	176
Sin tratar	5,8	6,3	6,3	6,8	5,3
PE; 1:10000 aspersión	6,8	6,8	7,8	7,3	7,5
PE; 1:25000 aspersión	7,5	7,5	7,8	7	7
PE; 1:50000 aspersión	7,5	7	6,8	6,8	6,5
Serenade	6,8	7,3	7,3	6,8	6,3
PE; 1:10000 goteo	7	7,3	6,5	7,5	6,5
PE; 1:25000 goteo	6	7,8	7,3	7,3	6,8
PE; 1:50000 goteo	7,8	6	7,3	7,5	6,3

Tabla 20. La clasificación del color de planta se indica el día después de la siembra.

Día	124	131	142	152	176
Sin tratar	2,8	3,8	6	6,5	3,3
PE; 1:10000 aspersión	4,3	4	7,8	8	4,5
PE; 1:25000 aspersión	4,3	4,5	7,5	7	4,8
PE; 1:50000 aspersión	4,8	4,3	6,8	7,3	5
Serenade	4,3	4,3	6,8	7	4
PE; 1:10000 goteo	4,8	4	7	7,3	5
PE; 1:25000 goteo	3,3	4,5	7,3	7,3	3,8
PE; 1:50000 goteo	4,8	3	6,8	7,8	3,3

Ejemplo 5b. Tratamiento de diferentes razas de tomate.

En este ejemplo se demostró el efecto bioestimulante del EXTRACTO de PTSO (PE) en diferentes razas de tomates y con diferentes cultivadores.

Alcance: se cultivaron plantas de tomate de diferentes razas con diferentes agricultores y se trataron con extracto de PTSO. En la tabla 20a se resumen las razas de tomate y los agricultores. Se usó el mismo régimen de cultivo de tomate como se describió en el ejemplo 5.

Tabla 20a. Razas de tomate aplicadas, datos de tratamiento y el porcentaje de incremento de rendimiento acumulado en comparación con plantas de tomate no tratadas de la misma raza cultivadas bajo las mismas condiciones al final del cultivo.

Agricultor	Raza de tomates	Dosis de EXTRACTO DE PTSO*	Número de tratamientos	Incremento de rendimiento de tomate (%)
#1	Mediavax	0,147 l/ha*	30**	11
#2	Capricia	0,147 l/ha	30	2
#3	Gerdicia	0,147 l/ha	30	9,5

*: La dilución depende de la evaporación de las plantas en ese momento y varía de 7.000 a 35.000x;

** : una vez por semana

Conclusión: el tratamiento con extracto de PTSO muestra claramente un incremento del rendimiento con todas las razas de tomate probadas y es ampliamente aplicable.

Ejemplo 6 Lechuga

Con base en los resultados anteriores, se preparó una composición agrícola que comprende 5,2 % de PTSO. La composición comprende además 59 % de emulsionante (propilenglicol y ricinoleato de gliceril polietilenglicol). La composición se refiere en la presente como "Composición de PTSO 5.2".

Se seleccionó un huerto de lechuga de campo abierto de la variedad Iceberg. Se

realizó un diseño de bloque completo aleatorizado, con 4 réplicas por tratamiento. Se llevaron a cabo seis aplicaciones por goteo a través del sistema de riego por goteo, con 120 kPa de presión y 10000 l/ha de volumen de agua.

5 Tratamiento 1: CHEQUE NO TRATADO + PROGRAMA DE AGRICULTOR
+ MATERIA ORGÁNICA 10 L/ha

Tratamiento 2: 0,5 l/ha Composición PTSO 5.2 + PROGRAMA DE AGRICULTOR +
MATERIA ORGÁNICA 10 l/ha.

Tratamiento 3: 1 l/ha Composición de PTSO 5.2 + PROGRAMA DE AGRICULTOR +
MATERIA ORGÁNICA 10 L/ha

10 En los ejemplos descritos en la presente, “PROGRAMA DE AGRICULTOR” se refiere a las condiciones de cultivo estándar usadas por los agricultores, tal como, por ejemplo, nutrientes, protección de cultivos estándar, régimen de luz, etc.

Tratamiento

15 Los tratamientos se aplicaron seis veces aproximadamente cada dos semanas con intervalos de 14-24 días. El último tratamiento se refiere como tratamiento “F” y 10 DA-F referido como soplado se refiere a la valoración realizada 10 días después del tratamiento final (tratamiento “F”).

20 El rendimiento comercializable (el número de lechugas por hectárea, los kilogramos de lechugas por hectárea (kg/ha), el peso por lechuga en gramos y el porcentaje de lechugas comercializables en la cosecha) se valoró a 10 DA-F. Además, el número de lechugas no comercializables por hectárea y el porcentaje de lechugas no comercializables en la cosecha, se llevó a cabo a 10 DA-F.

25 Cuando el tratamiento 1 se le da el valor 100 %, el resto de los tratamientos mostraron valores más altos para rendimiento comercializable. El tratamiento 3 mostró el valor más alto (102 % sobre el número de frutas por hectárea, 121 % sobre los kilogramos por hectárea, 118

% sobre los gramos promedio por fruta y 102 % sobre el porcentaje de lechugas comercializables en la cosecha), seguido del tratamiento 2 (101 % sobre el número de frutas por hectárea, 110 % sobre los kilogramos por hectárea, 108 % sobre los gramos promedio por fruta y 102 % sobre el porcentaje de lechugas comercializables en la cosecha).

5 Cuando el tratamiento 1 se le da el valor 100 %, el resto de los tratamientos mostraron valores más bajos para el rendimiento no comercializable. El tratamiento 3 mostró el valor más bajo (61 % sobre el número de frutas por hectárea y sobre el porcentaje de lechugas no comercializables en la cosecha) seguido del tratamiento 2 (69 % sobre el número de frutas por hectárea y sobre el porcentaje de lechugas no comercializables en la cosecha).

10 Se llevaron a cabo pruebas de laboratorio en 8 lechugas por parcela con etapa de desarrollo similar, se llevó a cabo una valoración a 10 DA-F, evaluando el peso fresco aéreo (g), el peso de raíz (g), la firmeza de lechuga (kg/cm²) y el diámetro de fruta (cm).

En cuanto al peso fresco de la parte aérea y el peso fresco de la raíz, cuando el tratamiento 1 se le da el valor 100 %, el resto de los tratamientos mostraron valores más altos.

15 El peso fresco más alto de la parte aérea y la raíz se obtuvo por el tratamiento 3 (117 % y 123 %, respectivamente), seguido por el tratamiento 2 (107 % y 101 %, respectivamente).

Con respecto al diámetro de lechuga, cuando el tratamiento 1 se le da el valor 100 %, el tratamiento 3 tuvo un valor de 107 % y el tratamiento 2 un valor de 104 %.

En cuanto a la firmeza de lechuga, cuando el tratamiento 1 se le da el valor 100 %, el
20 tratamiento 3 tuvo un valor de 133 % y el tratamiento 2 un valor de 125 %.

Finalmente, se tomaron 5 lechugas por parcela con una etapa de desarrollo similar de cada cosecha y se pesaron, se colocaron en una cámara fría a 6 °C y se evaluó la pérdida de peso por lechuga durante los siguientes

13 días; 92 DAP (días después de planta), 93 DAP, 94 DAP, 95 DAP, 96 DAP, 97 DAP, 98
25 DAP, 99 DAP, 100 DAP, 101 DAP, 102 DAP, 103 DAP y 104 DAP, calculando el porcentaje de peso perdido por lechuga durante todo el período de conservación. Entonces, se dejaron las mismas lechugas a temperatura ambiente (14 °C) y se reevaluó la pérdida de peso por lechuga en los 7 días siguientes; 105 DAP, 106 DAP, 107 DAP,

108 DAP, 1109 DAP, 110 DA y 111 DAP, calculando al final el porcentaje de pérdida de peso por lechuga en todo el periodo.

Ejemplo 7 Pepino

5 Se seleccionó un huerto de pepino de variedad Katrina. Las parcelas elementales fueron 18 m², con 13 plantas por parcela. Catorce aplicaciones por goteo (aplicaciones ABCDEFGHIJKLMN) para la composición 5.2 de PTSO y siete aplicaciones (ACEGIKM) para IsabionTM, se llevaron a cabo usando un sistema de riego por goteo, con 10000 l/ha de volumen de agua y con 120 kPa de presión. Las aplicaciones se llevaron a cabo con un intervalo de 7 días para la composición 5.2 de PTSO y 14 días para IsabionTM.

10 Tratamiento 1: VERIFICACIÓN NO TRATADA

Tratamiento 2: Verificación de agricultor

Tratamiento 3: 0,4 l/ha Composición de PTSO 5.2 + Isabion 4L/ha + 41 g de aminoácidos libres, 40 g de nitrógeno, 118 g de carbono orgánico

Tratamiento 4: 0,4 l/ha Composición de PTSO 5.2

15 El rendimiento comercializable (los kilogramos de frutas por hectárea (kg/ha), el número de frutas por hectárea y peso de frutas (g), se valoró a 3 DA-B (es decir, 3 días después del tratamiento B), 6 DA-B, 3 DA-C, 6 DA-C, 3 DA-D, 6 DA-D, 3 DA-E, 7 DA-E, 4 DA-F, 1 DA-G, 5 DA-G, 3 DA-H, 6 DA-H, 3 DA-I, 7 DA-I, 5 DA-J, 3 DA-K, 7 DA-K, 4 DA-L, 1 DA-M, 5 DA-M y 3 DA-N calculando al final, el rendimiento total y promedio. El diámetro y la
20 longitud de la fruta (mm) se evaluaron a 3 DA-E y 7 DA-K.

En cuanto al rendimiento comercializable (kg de frutas por hectárea y número de frutas por hectárea), cuando el tratamiento 1 se le da el valor 100 %, el tratamiento 3 obtuvo el mayor rendimiento (116 % en kg/ha y 113 % en número de frutas), seguido del tratamiento 4 (112 % en kg/ha y 110 % en número de frutas) y el tratamiento 2 (104 % en kg/ha y 104 % en número
25 de frutas).

En cuanto al diámetro de la fruta, cuando el tratamiento 1 se le da el valor 100 %, el tratamiento 3 dio por resultado 103-104 %, el tratamiento 4 dio por resultado 102-104 % y el tratamiento 1 102 -103 %.

5 En cuanto a la longitud de la fruta, cuando el tratamiento 1 se le da el valor 100 %, el tratamiento 3 dio por resultado 106-107 %, el tratamiento 4 dio por resultado 106 % y el tratamiento 1 103-105 %.

Ejemplo 8 Tratamiento de plantas de *Cymbidium* clonadas

10 Los agricultores de *Cymbidium* que producen flores de corte usualmente tienen que cultivar sus propias plantas antes de que pueda tener lugar la producción de flores. A fin de obtener flores que sean lo más uniformes posible, tienen que precultivar sus plantas a partir de clones (meristemos): puede tomar 5 años o más antes de que la producción de flores esté en el nivel económicamente deseado.

15 El crecimiento y desarrollo de las plantas abarca tres etapas: (1) crecimiento vegetativo durante el cual se forman pseudobulbos al final de la formación de brotes, (2) inducción de flores y (3) desarrollo de tallos de flores. Es económicamente interesante mantener el tiempo de crecimiento lo más corto posible para hacer crecer las plantas hasta el tamaño de floración. En este diseño experimental se usa un extracto de PTSO (al menos 56 % de PTSO emulsionado (PE)) para demostrar el efecto bioestimulante de PTSO en plantas jóvenes de *Cymbidium*.

20 Para este propósito, se seleccionaron plantas jóvenes de meristemo de la orquídea *Cymbidium* "49er". Las plantas aún tenían que desarrollar el primer pseudobulbo después del trasplante del matraz. Después de los tratamientos como se menciona más adelante, las plantas se evaluaron como se indica más adelante después de 206 días.

Diseño experimental

25 Procedimiento de cultivo de plantas

Las plantas de *Cymbidium* “49er” se produjeron a partir de meristemas. Tras la entrega en el agricultor de *Cymbidium*, las plantas se colocaron en macetas negras de 9 cm en turba de coco de tamaño mediano a la cual se adicionaron gránulos de fertilización de Osmocote (1,25 kg/, M³). Las plantas se alimentaron dos veces al día con 40 ml de alimento fertilizado (EC 0.4) mediante un sistema de riego automático mediante un sistema de infusión. Las plantas se adaptaron a las condiciones del invernadero y el tratamiento con EXTRACTO de PTSO comenzó aproximadamente 4 meses después de volver a colocar en macetas.

En el ejemplo, se usaron 25 plantas por tratamiento. La distancia entre las plantas fue aproximadamente 15 cm. Las plantas se monitorearon en el crecimiento de las hojas al medir la longitud y el mayor ancho de la hoja más grande, en la formación de pseudobulbos, el tamaño y la apariencia final y el número de brotes nuevos. El número de raíces y puntas de raíces verdes se monitoreó por inspección visual. Además, se realizó un juicio total sobre las plantas con respecto a la apariencia y la salubridad. Por tratamiento, se juzgaron de 8 a 24 plantas.

Las diluciones de extracto de PTSO, la frecuencia y tiempo de intervención entre los tratamientos recurrentes se indican en la tabla 21. Las plantas se administraron manualmente con 40 ml del extracto de PTSO de dilución indicado. El control se regó con 40 ml del alimentación vegetal fertilizada estándar como se indicó anteriormente. Después de los tratamientos, las plantas tratadas se someten al mismo procedimiento de cultivo que las plantas de control, es decir, las plantas no tratadas.

Tabla 21. Resumen de los tratamientos aplicados durante el experimento.

Número de tratamiento	Tasa de dilución Extracto de PTSO	Número de tratamientos	Tiempo de intervención
1 = control	n.a.	ninguno	-
2	1000x	1	n.a.-
3	1000x	2	1 semanas
4	1000x	3	1 semanas
5	1000x	4	1 semanas
6	2500x	1	n.a.
7	2500x	2	1 semanas

8	2500x	3	1 semanas
9	2500x	4	1 semanas
10	1000x	10	2 semanas
11	2500x	10	2 semanas

n.d.: no aplicable

Las plantas se puntuaron en las variables indicadas en t = 0, t = 112 días y t = 206 días.

5 La altura y espesor del pseudobulbo, la longitud y ancho se midieron por el uso de una línea de cinta. La cantidad de raíces y las puntas de raíces blancas frescas en crecimiento se estimaron en una escala de 1 – 10.

10 La cantidad de raíces se juzgó después de la comparación de las raíces de una planta con una planta con una formación de raíces promedio del grupo de control. Para este propósito, las plantas se sacaron de la maceta y se compararon con una planta estándar que se considera como “promedio” del tratamiento de control.

15 El número de puntas de raíces frescas se juzgó de la siguiente manera. 1: 0 – 20 % de las raíces mostraron puntas de raíz blancas en crecimiento; 2: 20 – 40 % de las raíces mostraron puntas de raíz blancas en crecimiento; 3: 40 – 60 % de las raíces mostraron puntas de raíces frescas en crecimiento; 4, 60 – 80 % de las raíces tuvieron puntas de raíces blancas en crecimiento; 5: 80 – 100 % de las raíces mostraron puntas de raíz blancas en crecimiento. La “Aparición de nuevos brotes” se calcula como el número de nuevos brotes dividido por el número total de plantas juzgadas del tratamiento.

20 La “robustez” de las plantas fue un juicio arbitrario que se dio después de que una planta se comparó con una planta promedio del grupo de control y varió de 1 a 10: 1 es la puntuación más baja y un 10 es la puntuación más alta.

Resultados

En las tablas 22 - 24 se presentan los resultados de los promedios de los tratamientos.

Tabla 22. Promedio de variables de calidad de plantas de *Cymbidium* 49er a t = 0.

dev: la hoja seguía creciendo y aún no era posible realizar una medición objetiva

	Tratamiento											
Variable de clasificación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Número de hojas	12,1	12,1	11,8	11,6	12,8	12,4	12,5	12,6	11,9	11,6	12,0	
Altura pseudobulbo (cm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,75	
Espesor pseudobulbo (cm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,44	0,44	
Longitud hoja más larga (cm)	49,5	dev	dev	dev	dev	dev	dev	dev	dev	dev	dev	
Mayor ancho de la hoja más larga (mm)	20,0	dev	20,1	19,6	20,5	20,0	18,0	19,0	19,9	19,0	19,8	
Aparición de nuevos brotes	0	0	0	0	0,36	0	0,13	0,13	0	0,13	0,13	
Cantidad de raíces	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Puntas de raíces en crecimiento	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Robustez planta	4,0	3,9	4,0	3,5	4,5	4,3	4,1	4,8	4,1	4,4	4,1	
Clasificación	9	10	8	11	2	4	6	1	7	3	5	

Tabla 23. Promedio por tratamiento de las variables de calidad de plantas de *Cymbidium* 49er a t = 112 días.

5

N.D.: no determinado

	Tratamiento											
Variable de clasificación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Número de hojas brote adulto/ Número de hojas nuevo brote	9,6/1,8	10,1/2,5	9,8/3,2	9,8/1,5	11/1,9	10,8/2,4	9,5/2,9	8,9/2,8	10,4/1,5	9,6/2,6	9,1/2,7	
Altura pseudobulbo (cm)	5,0	4,9	5,7	4,7	5,1	5,0	5,6	5,4	3,8	4,6	5,0	
Espesor pseudobulbo (cm)	3,1	3,3	3,6	3,1	3,2	3,6	3,5	3,1	2,8	3,1	3,5	
Longitud hoja más larga (cm)	13,4	15,4	17,8	11,2	8,8	18	20,7	28	9,9	17,6	22,9	
Mayor ancho de la hoja más larga (mm)	20	N.D.	20,1	19,6	20,5	20	17,8	19	19,9	19	19,8	
Aparición de nuevos brotes	1,8	2,5	3,2	1,5	1,9	2,4	2,9	2,8	1,5	2,6	2,7	
Cantidad de raíces	3,8	4,5	5,2	3,9	4,7	5,5	4,6	4,9	4,2	4,3	5,9	
Puntas de raíces en crecimiento	4	1	4	4	5	4	2	2	3	4	4	
Robustez planta	3,8	4,5	4,2	4,5	4,4	5,3	5,9	6,1	5,0	5,2	6,3	
Clasificación	11	7	10	8	9	4	3	2	6	5	1	

Tabla 24. Promedio por tratamiento de las variables de calidad de plantas de *Cymbidium* 49er a t = 206 días.

	Tratamiento											
Variable de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	

clasificación												
Número de hojas brote adulto/ Número de hojas nuevo brote	9,6/ 5,2	10,1/5,1	9,8/ 5,1	9,8/ 4,3	11/ 5,2	10,8 /4,3	9,5/ 5,3	8,9/ 6,2	10,4/4,7	9,6/ 5,2	9,1/ 5,8	
Altura pseudobulbo (cm)	5,0	4,9	4,7	4,7	5,1	5,0	5,6	5,4	3,8	4,6	5,6	
Espesor pseudobulbo (cm)	3,1	3,3	3,1	3,1	3,2	3,6	3,5	3,1	2,8	3,1	3,6	
Longitud hoja más larga (cm)	38,5	36,7	40,9	33,5	34,8	33,5	39,5	36,0	28,8	37,9	42,3	
Mayor ancho de la hoja más larga (mm)	24,3	23,2	26,6	24,7	24,7	24,7	22,8	25,3	24,5	26,5	24,1	
Aparición de nuevos brotes	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	1,2	1,00	1,1	1,1	
Cantidad de raíces	4	5	5	4	4	4	5	5	5	5	5	
Puntas de raíces en crecimiento	4	5	4	4	3	4	5	5	5	5	5	
Robustez planta	4,0	4,1	4,2	3,8	4,2	3,8	4,7	4,6	5,0	4,8	6,2	
Clasificación	9	8	6	11	7	10	4	5	2	3	1	

N.D.: no determinado

5 Durante los experimentos, todas las plantas se desarrollaron bien y no se detectaron efectos negativos sobre las plantas por el extracto de PTSO. Se hizo una clasificación para las plantas en $t = 0$ (tabla 2), pero estrictamente hablando, las diferencias entre las plantas fueron extremadamente pequeñas. Esto es habitual para las plantas que se cultivan a partir de meristemos y se cultivan bajo las mismas condiciones durante 4 meses antes del inicio del experimento. En lo sucesivo, las plantas se trataron de acuerdo con el programa que se presenta en la tabla 21.

Después de 112 días, las plantas de tratamiento 11 fueron significativamente más grandes y más robustas (tabla 23). Una planta robusta bien desarrollada con una puntuación alta es una planta con pseudobulbos relativamente grandes (para el almacenamiento de carbohidratos de reserva), gran superficie foliar (para fotosíntesis), un nuevo brote grande de rápido crecimiento y un sistema radicular bien desarrollado para la captación de agua y minerales. La dosificación repetida de EXTRACTO de PTSO dio por resultado más efectos positivos (ver, por ejemplo, tratamientos 7-11).

Ejemplo 9 Efecto de los compuestos organosulfurados en lechuga y pimientos dulces

Diseño experimental. Los efectos bioestimulantes de los compuestos organosulfurados se probaron en lechuga y pimiento dulce (*Capsicum annuum* "Ritmico"). Los compuestos probados incluyen disulfuro de di-n-propilo (CAS 629-19-6), tiosulfonato de di-n-propilo (es decir, PTSO, CAS 1113-13-9), tiosulfonato de di-metilo (CAS 2949-92-0) y tiosulfonato de di-fenilo (Cas 1212-08-4). El tiosulfonato de di-metilo y tiosulfonato de di-fenilo se ordenaron de Adrich-Sigma. PTSO se purificó como se describe en el ejemplo 1. A fin de obtener una emulsión estable y homogénea, los compuestos se disolvieron en una solución emulsionante (tabla 25) para asegurar que los cultivos se suministren con la solución definida. De esta manera se evita que se presenten precipitaciones o inmiscibilidad de los compuestos organosulfurados. Como ejemplos en la presente, "Composición de PTSO 5.2" se refiere a una composición agrícola que comprende 5,2 % de PTSO y comprende además 59 % de emulsionante (propilenglicol y ricinoleato de gliceril polietilenglicol). "Composición de PTSO 5.2 Yuka" en una composición agrícola que comprende 5,2 % de PTSO y 90,2 % de extracto de Yuka. "Composición de PTSO 5.2 Tween" en una composición agrícola que comprende 5,2 % de PTSO, 30,1 % de Tween, 30,1 % de DMSO y 30 % de agua. Los controles y tratamientos se indican en la tabla 27.

La dosis de los compuestos de prueba se estandarizó con base en la dosis molar y se administró la misma dosis molar que PTSO. Las emulsiones se prepararon al adicionar la cantidad requerida de los compuestos como se indica en la tabla 25 en volúmenes de 100 ml de 50 % de Tween 80 y 50 ml de DMSO. Posteriormente, los volúmenes se complementaron a un volumen final de 250 ml con la misma mezcla y la incubación tuvo lugar en un agitador orbital a 37 °C (30 minutos, 250 rpm).

Tabla 25. Soluciones madre de los productos indicados y compuestos organosulfurados que se usan para las pruebas bioestimulantes.

Compuesto/Producto	Descripción	Concentración final de compuesto organosulfurado en existencias (M)	Porcentaje en solución madre (v/v)
Control	Tween-DMSO		
Composiciones de PTSO 5.2	Extracto de PTSO	0,4	7
PTSO puro (>98 % de pureza)	PTSO puro en Tween-DMSO	0,4	7
Disulfuro de di-n-propilo (99 %)	DPDS puro en Tween-DMSO	0,4	6
Tiosulfonato de dimetilo (97 %)	Dimetil tiosulfonato en Tween-DMSO	0,4	5
Tiosulfonato de di-fenilo (99 %)	Tiosulfonato de di-fenilo en Tween-DMSO	0,4	10
Composiciones de PTSO 5.2 Yuka	Croptimum BIO (89 % de yuca+ extracto de PTSO)	0,4	10
Composiciones de PTSO 5.2 Tween	Extracto de PTSO en Tween-DMSO	0,4	7

Antes de la siembra, las semillas de lechuga se empaparon en emulsiones diluidas 1000x como se indica en la tabla 25 y se incubaron durante 10 minutos. Cada tratamiento se realizó en 4 veces. En la tabla 26 se resumen las configuraciones de crecimiento de lechuga y pimientos dulces y en la tabla 27 se presenta un resumen de las condiciones de crecimiento realizadas y la cosecha de cultivo de lechuga.

Como se demuestra en la tabla 27, todos los tratamientos de lechuga mostraron un incremento en el peso fresco relativo/planta en comparación con el control y peso incrementado de cosecha por planta en comparación con el control. En el momento de medir

el crecimiento de los pimientos, aún no había frutas presentes. Sin embargo, los resultados preliminares indican que todos los tratamientos condujeron a un incremento en el vigor de cultivos como se mide por el tamaño relativo en comparación con el control.

Tabla 26. Condiciones de cultivo, configuraciones y tratamiento de lechuga y pimiento

5 dulce.

Cultivo / raza	Condiciones de cultivo			Configuraciones		Tratamiento					Terminar
	Número de plantas o área de cultivo/ tratamiento	Sustrato de raíz	Alimentación de planta *	Temperatura	Alimentación de planta	Inicio del tratamiento	Dilución	Cantidad total de producto por tratamiento (litros/ha)	Número de tratamientos/frecuencia	Replicaciones	Última evaluación del experimento después de ...días (después de siembra)
Pimiento dulce (<i>Capsicum annuum</i>) "Ritmico"	80	tierra, suelo franco	goteo	Aireación fija, máx. 40 °C	Goteo	7 semanas después de siembra	17000	0,6	5; una vez cada 7 días	4	91
Lechuga Lactuca sativa "volare"	180	Suelo para macetas estándar	Riego manual	21 °C	n.a.	Durante siembra	1000	n.a.	1	4	17 días después de siembra

Tabla 27. Se valoraron los parámetros de crecimiento durante el experimento y las características del cultivo/ cosecha

Cultivo	Tratamiento	Condiciones reales de crecimiento de variabilidad	Parámetros de cultivos	
---------	-------------	---	------------------------	--

		Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Suministro de alimentación de planta	Suministro de luz	Cosecha Peso fresco/planta	Peso fresco relativo/planta en comparación con control (%)	Formación de raíz (%) en comparación con control	Cosecha adicional (peso) por planta en comparación con control (%)	Tamaño relativo en comparación con control (%)
Lechuga Lactuca sativa "volare"	Solución emulsionante (Control)	21	70 - 95	Se mantiene húmedo	Tubos LED de 25 vatios a 30 cm por arriba de las plantas. Después de la germinación, se removió la tapa de la caja de semillas	1,63	100	100		ND
	Composiciones de PTSO 5.2					1,93	118	114	18	
	Disulfuro de di-propilo					1,80	110	109	10	
	Tiosulfonato de di-n-propilo					1,84	113	110	13	
	tiosulfonato de di-metilo					1,96	120	115	20	
	Tiosulfonato de di-fenilo					1,68	103	93,9	3	
	Composiciones de PTSO 5.2 Yuka					2,21	136	130	36	
	Composiciones de PTSO 5.2 Tween					1,74	107	96,8	7	
Capsicum annuum "Ritmico"	Solución emulsionante (Control)	18 – 35	90 - 20	Goteo	Soleado	Todavía no	ND	ND	n.a.	
	Composiciones de PTSO 5.2									2,2
	Disulfuro de									2,8

	di-propilo									
	Tiosulfonat o de di-n- propilo									4,2
	tiosulfonato de di-metilo									6,1
	Tiosulfonat o de di- fenilo									2,8
	Composicio nes de PTSO 5.2 Yuka									0,6
	Composicio nes de PTSO 5.2 Tween									2,4

ND: No determinado; n.d.: no aplicable

Ejemplo 10 Análisis de PTSO en aceite de cebolla y ajo

Alcance: se obtuvieron aceite de cebolla y ajo y extractos de cebolla y ajo como se describe en Hemat S. Abd El-Salam et al. (2014)(I Enhancement of Cumin (Cuminum cyminum L.) Productivity Using Some Natural Plant Extracts. Egypt. J. Hort. Vol. 41, No. 2, p 209-219. Las muestras se analizaron para la presencia de PTSO de la siguiente manera.

Diseño experimental: La presencia de PTSO (tiosulfonato de di-n-propilo) se detectó por LC-MS/MS. Los estándares de PTSO (CAS 1113-13-9) se obtuvieron por síntesis orgánica de Symeres (Mercachem Holding B.V.). La identidad del compuesto se confirmó por ¹H-RMN y LC-MS y la pureza se determinó por LC-UV y se determinó que es > 99,1 %.

Esta muestra se usó para preparar gráficas de equilibrio. Para la adición y equilibrio, se prepararon muestras que contenían PTSO puro de 2 a 200 µM en metanol de grado HPLC.

El LC-MS/MS (API4000, Sciex) tenía la siguiente configuración: la configuración de

modo de sincronización es LC-Sync, como precolumna se usaron Vanguard BEH C18 2,1 x 5 mm y como columna de HPLC Acquity BEH C18 2,1 x 50 mm 1,7 µm. El inyector se suministró por Nexera.

El horno se ajustó a 40 °C. El modo de bombeo fue de flujo ternario. Las configuraciones de la bomba fueron los siguientes: el flujo total fue 0,4 ml/min; la concentración de bomba B (%) es de 0,0, concentración de bomba C (%) es 50,0. Las curvas de la bomba B y la bomba C fueron 0, los límites de presión mínima y presión máxima fueron 0 y 110316,12 kPa (16,000 psi), respectivamente. Se usó la bomba A para la solución LC-A (0,05 % de FA (ácido fórmico) en 5 % de metanol en UPW (agua ultrapura)). La bomba C se usó para bombear metanol.

Configuraciones MS:

Tabla 28

General	
Fuente de iones	Sonda TIS
Desplazamiento de fuente de iones (mm)	Altura 0,0 / Centro 5,0
Período 1	
Tiempo de adquisición (min)	2,0
Tipo de escaneo	MRM positivo
Resolución Q1	Unidad
Resolución Q3	Unidad

Tabla 29

Configuraciones de fuente de MS	
Fuente de MS	Configuración de MS
CUR (gas de cortina) (psi (kPa))	40 (275,79)
CAD (gas de colisión)	6
GS1 (gas nebulizador) (psi (kPa))	60 (413,685)
GS2 Turbo Gas	70
IS (aspersión iónica) (V)	5500
TEM (Temperatura) (°C)	350

lhe (calentador de interfaz)	encendido
------------------------------	-----------

Método: los estándares de calibración en el intervalo de 2,00 a 200 µM (PTSO) se prepararon recientemente en MeOH.

- 5 El aislamiento de PTSO de las muestras se realizó por extracción en solvente orgánico (metanol (MeOH), acetato de etilo (EtOAc), n-butanol y diclorometano (DCM)). La relación entre la muestra y la solución de extracción es máxima 1 o menor. La investigación preparativa mostró que la eficiencia de extracción de la muestra está entre 30 y 40 % y por lo tanto, se deben incluir muestras de referencia en el procedimiento.

El automuestreador inyectó volúmenes de muestra de 20 µl.

Los extractos se analizaron usando un sistema API 4000 LC-MS/MS (PTSO).

- 10 La adquisición de datos se realizó usando el software Analyst (versión 1.6.3) de AB Sciex. Después de la integración de área de pico, la regresión también se realizó usando Analyst. Las concentraciones se calcularon usando regresión lineal ponderada, de acuerdo con la siguiente fórmula: $y = a + bx$ (factor de ponderación = $1/x^2$) donde: x = concentración de PTSO en µM y = Relación de área de pico a = Intercepción b = Pendiente.

- 15 El intervalo de calibración para PTSO es 2,0 – 200 µM, el intervalo de ensayo cuantitativo > 2,0 µM, el intervalo de ensayo cualitativo es > 1,0 µM, ambos con un volumen de muestra de 20 µl.

Resultados:

Tabla 30

Muestra	PTSO detectado (mg/l)
Aceite de cebolla	< 0,2
Aceite de ajo	< 0,2
Extracto de cebolla	< 0,2
Extracto de ajo	< 0,2

A partir de estos resultados se demuestra que no se detectó PTSO en la cebolla y el ajo derivados de los respectivos aceites y extractos.

Ejemplo 11 Efectos en otros cultivos

Alcance: Los efectos del extracto de PTSO se probaron en otros cultivos diferentes.

- 5 Las tablas describen los resultados de cultivos donde se observó un efecto visible en al menos una variable medida.

- Diseño de estudio: La tabla 32 resume los cultivos probados con las condiciones de crecimiento y tratamientos correspondientes. Los cultivos se precultivaron con agricultores de plantas y se plantaron en invernaderos de plástico con aireación constante (día y noche) o en
10 los campos abiertos. Las plantas se alimentaron mediante tapones o agua de riego. Todos los nutrientes en la alimentación de planta se suministraron en exceso. Dependiendo de los cultivos, las frutas se cosecharon a intervalos de tiempo regulares y se determinó el peso acumulado de las frutas. El extracto de PTSO se suministró mediante las raíces mediante la alimentación de la planta. Con un número limitado de cultivos, también se midió la formación
15 de raíces y contenido de clorofila.

- En la tabla 32 se presentan las variables de crecimiento que se monitorearon y las cosechas. La temperatura de los parámetros de crecimiento, humedad relativa y suministro de luz varían considerablemente debido a que estos parámetros no fueron controlados y dependen de las condiciones climáticas que cambian durante el día. Las condiciones
20 climáticas están cambiando con las estaciones y por lo tanto, el mes en que se iniciaron los experimentos se indica en la tabla. En junio, la intensidad de la luz es mayor y la variabilidad de la temperatura día-noche, la humedad relativa y la evaporación correspondientes son mayores. Estas variabilidades (extremas) dan por resultado un alto estrés abiótico. Puesto que se asume que el extracto de PTSO reduce la sensibilidad de las plantas al estrés abiótico,
25 se esperaba que cuanto mayores sean los cambios de los factores de estrés abiótico, más pronunciados serán los efectos positivos del tratamiento en los cultivos.

La tabla 33 demuestra que el extracto de PTSO no mostró ningún efecto negativo en las propiedades del cultivo como hojas dañadas, color del cultivo, hojas o tamaño deformado, tallos, forma de la fruta y flores y no afectó negativamente la formación de raíces. La condición

del cultivo no cambió o mejoró.

Las condiciones de crecimiento se mantuvieron iguales para las plantas tratadas con extracto de PTSO y no tratadas (controles). Esto implica que la eficiencia de uso de nutrientes fue mayor para las plantas tratadas con extracto de PTSO y esto hace que el PTSO sea un bioestimulante.

Puesto que la aireación del invernadero fue constante durante el día y no se controló como una función de la temperatura, se esperan desviaciones de alta temperatura y humedad dependiendo del viento y el sol. La humedad relativa del aire varía inversamente proporcional a la temperatura, por lo que también se esperan grandes desviaciones. El suministro de agua de riego también puede volverse limitante durante los períodos calurosos y esto da como resultado la captación de muy poca captación de agua y la pérdida de turgencia celular, lo que da como resultado hojas colgantes y el cierre de los estomas. En ese momento se detiene la fotosíntesis. Estos factores ambientales no controlados dan por resultado mucho estrés abiótico, y en tanto que no se desea que se limite por teoría, se sugiere que el extracto de PTSO disminuya el efecto del estrés abiótico en las plantas, dando por resultado mayor nivel de metabolitos relacionados con la fotosíntesis, cultivos más sanos y mayores rendimientos de cultivos. Dependiendo del cultivo, se observaron propiedades positivas adicionales, como un sistema radicular mejorado y un nivel más alto de clorofila (tabla 33). Se obtuvo un crecimiento significativamente más rápido y mejores propiedades de cultivo con otros cultivos (tallos de rosa, más gruesos y/o más largos y hojas brillantes; melones, hojas más verdes y más grandes; frijoles, un cultivo significativamente más grande; tomates, una cabeza más grande y más clorofila).

La tabla 31 proporciona un resumen de las características mejoradas del cultivo después del tratamiento con extracto de PTSO. No se monitorearon todas las características posibles de los cultivos, por lo que es probable que otras características también mejoraran, pero no se midieron en el presente experimento.

Tabla 31.

Cultivo	Característica de cultivo mejorada
Phalaenopsis	Más raíces, plantas más grandes, más brillo en

	las hojas
Cymbidium	Pseudobulbos y forma más grandes
Chrysanthemum	Más raíces, plantas más grandes
Pimiento dulce (<i>Capsicum annuum</i>)	Más cosecha (peso total de fruta y número de fruta), mayor contenido de clorofila
Calabacín (<i>Cucurbita pepo giromontiina</i>)	Más frutas y mayor peso total de fruta
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Más frutas, mayor peso total de fruta, mayor diámetro de fruta, más BRIX, mejor sabor
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	Más frutas y mayor peso total de fruta
Frijoles verdes (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Mayor peso de fruta, más raíces
Frijoles verdes (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Mayor peso de fruta, más raíces
Brócoli de tallo blando (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>)	Más peso cosechado
Bok Choi (<i>Brassica rapa chinensis</i>)	Más peso cosechado
Guisantes (<i>Pisum sativum</i>)	Más peso de fruta cosechada
Rosa (<i>Rosa</i>)	Crecimiento y desarrollo más rápidos, tallos más gruesos, hojas más brillantes, flores más comercializables.
Uvas (<i>Vitis vinifera</i>)	Más peso cosechado
Arándanos (<i>Vaccinia corymbosum</i>)	Más peso cosechado
<i>Cucumis melo</i>	Más fruta cosechada

Tabla 32. Condiciones de cultivo, configuraciones y tratamiento de diferentes cultivos. La humedad relativa no se controló en los invernaderos y no se produjeron rayos artificiales. La alimentación de planta se administra de forma manual o automática. Con respecto al control climático no se usaron configuraciones para controlar la temperatura, la ventilación se dispone de tal manera que no se presente sobrecalentamiento de las plantas.

Cultivo/ raza	Condiciones de cultivo			Configuraciones			Tratamiento					Terminar
	Número de plant	Ubicación y Espaciamento	Sustrato de raíz	Fecha o mes en que comenzó	T (°C)	Alimentación de planta	Iniciotmnt	Dilución	Dosis de extracto	Número de tmnts/frecuen	Repeticiones por tmnt (=n)	Detener el experimento

	as área/ tmnt *	plantas		ó el experim ento					de PTS O por tmnt (litro s/ ha)	cia		despué s de ...sema nas despué s de iniciar el experim ento
Pimiento dulce (<i>Capsicu m annuum</i>) "Martinic a"	200	En invernade ro Espacio de fila:0,5 m Ancho de fila:2,0 m 20.000 plantas/ha	tierra, suelo franc o	10 Aug	Airea ción fija, máx. 40 °C	Goteo	22 semanas después de siembra	1400 0	0,7	9; una vez cada 9 días	4	21
Pimiento dulce (<i>Capsicu m annuum</i>) "Palerm o"	51	En invernade ro Espacio de fila:0,35 m Ancho de fila:2,0 m 28.600 plantas/ha	tierra, suelo franc o	6 sep	Airea ción fija, máx. 40 °C	Goteo	8 semanas después de siembra	1400 0	0,7	19, una vez cada 7- 8 días. Isabion: 10, una vez cada 14 días	4	28
Calabací n (<i>Cucurbi ta pepo giromont iina</i>) "Sinatra"	40	En invernade ro Espacio de fila:0,4 m Ancho de fila:2,0 m	tierra, suelo franc o	10 Nov	Airea ción fija, máx. 40 °C	Goteo	3 semanas después de siembra	3330 0	0,3	20; una vez a la semana Isabion: 10, una vez cada 14 días	3	24
Tomate (<i>Solanu m</i>)	48	En invernade ro	tierra, suelo franc	7 Nov	Airea ción fija,	Goteo	9 semanas después	1700 0	0,6	12; una vez cada 10	4	21

<i>lycopersicon</i> "arbol"		Espacio de fila:0,5 m Ancho de fila:2,0 m	o		máx. 40 °C		de siembra			días Isabion: 10, una vez cada 14 días		
<i>Cucumis sativus</i> "Katrina" Pepino	13	En invernadero Espacio de fila:0,7 m Ancho de fila:2,0 m	suelo arcilloso	26 Nov	Aireación fija, máx. 40 °C	Goteo	Inmediatamente después de siembra	25000	0,4	14; cada semana	4	13
Frijoles verdes <i>Phaseolus vulgaris</i> "...." sperziebonen	62500 (0,5ha)	En los campos Espacio de fila:0,2 m Ancho de fila:0,4 m	Suelo franco	13 Ene	Libre	n.a.	7 de febrero (mismo año)	40000	1,25	11; una vez por semana	1	18
Frijoles verdes <i>Phaseolus vulgaris</i> "...." (Snijbonen)	62500 (0,5ha)	En los campos Espacio de fila:0,2 m Ancho de fila:0,4 m	Suelo franco	13 Ene	Libre	n.a.	7 de febrero (mismo año)	40000	1,25	11; una vez por semana	1	18
Brócoli de tallo blando (<i>Brassica oleracea</i> var. italic) "...."	62500 (0,5ha)	En los campos Espacio de fila:0,2 m Ancho de fila:0,4 m	Suelo franco	13 Ene	Libre	n.a.	7 de febrero (mismo año)	40000	1,25	11; una vez por semana	1	18
Bok	48	En	arcilla	15 sep	Libre	n.a.	1 de	4000	1,25	4	1	13

Choi (<i>Brassica rapa chinensis</i>) "Joi choi"		invernadero Espacio de fila: 0,2 m Ancho de fila: 0,6 m					octubre (mismo año)	0				
Guisantes (<i>Pisum sativum</i>) "...." (Tuinerwten)	62500 (0,5ha)	En los campos Espacio de fila: 0,2 m Ancho de fila: 0,4 m	Suelo franco	13 Ene	Libre	n.a.	7 de febrero (mismo año)	40000	2,5	11; una vez por semana	1	7
Rosa (Rosa) "Athena"	40000 (0,5ha)	En invernadero Espacio de fila: 0,25 m Ancho de fila: 0,50 m	Suelo franco	Dec	Libre	Agua de riego	Después de un mes	40000	1,5	11; una vez por semana	1	25
Uvas (<i>Vitis vinifera</i>) "Tempranillo"	39	En los campos Espacio de fila: 1,25 m Ancho de fila: 1,75 m	Suelo franco	1 de junio	Libre	Agua de riego	1 de junio (mismo año)	40000	1,0	8	3	14
Arándanos (<i>Vaccinium corymbosum</i>) "Ventura"	320	En los campos Espacio de fila: 0,9 m Ancho de fila: 3 m	arenoso	Marzo	Libre	Agua de riego	Marzo (mismo año)	17000	0,6	12 tratamientos, una vez por semana	4	16
Melón (<i>Cucumis</i>)	13300	En los campos	Suelo franco	23 de junio	Libre	Agua de riego	20 de julio (mismo año)	40000	0,9	6 tratamientos	4	15

us melo)	(1ha)	Espacio de fila: 0,5	o areno so				año)			ntos, cada 10 días		
"Piel de Sapo"		Ancho de fila: 1,5 m										

*: tmnt = Tratamiento

Tabla 33. Se valoraron los parámetros de crecimiento durante el experimento y las características del cultivo/ cosecha. Todos los cultivos se cultivaron al aire libre en un clima soleado

Cultivo	Condiciones reales de crecimiento de variabilidad			Parámetros de cultivos		Observaciones
	T (°C)	Humedad relativa (%)	Suministro de alimentación de planta	Efecto en el vigor de planta en comparación con control	Cosecha adicionada en comparación con control (% basado en kg)	
Pimiento dulce (<i>Capsicum annuum</i>) "Martinica"	10 - 40	95 - 30	Manguera de goteo de caucho	ND*	+ 14	las hojas contuvieron un nivel más alto de clorofila y 165 % más de raíces
Pimiento dulce (<i>Capsicum annuum</i>) "Palermo"	10 - 40	95 - 30	Manguera de goteo de caucho	ND	+ 16%	Las plantas tratadas únicamente con PTSO mostraron Brix más alto. Extracto de PTSO; 19 % más de frutas en combinación 16 % más de kg. Extracto de PTSO combinado con Isabion 3 l/ha dosificado una vez cada 14 días: 37 % más de frutas en combinación y 29 % más de kg

Calabacín (<i>Cucurbita pepo giromontiina</i>) "Sinatra"	18 - 35	95 - 30	Manguera de goteo de caucho	ND	+ 9	Valoración cada 3 días. Extracto de PTSO; 9 % más de kg; Otro diseño experimental, Extracto de PTSO combinado con Isabion 3 l/ha que se dosificó una vez cada 14 días. Con Isabion + Extracto de PTSO; 12 % más de frutas en combinación y 10 % más de kg
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) "arrebol"	18 - 35	95 - 30	Manguera de goteo de caucho	ND	+ 5,5 / +15	con los niveles de clorofila del extracto de PTSO, sabor y BRIX fueron mejores, 8 % más de frutas y 2 % más de kg de frutas/ha. En otro diseño, se combinó extracto de PTSO con Isabion 3 l/ha (se dosificó una vez cada 14 días).
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>) "Katrina"	18 - 35	95 - 30	Manguera de goteo de caucho	ND	+12	Extracto de PTSO; 12 % más de kg y 10 % más de fruta. 13 % más de frutas en combinación con Extracto de PTSO con Isabion que se dosificó una vez cada 14 días y 16 % más de kg y 4 % más de diámetro de fruta
Frijoles verdes	15 -	100-50	Manguera de	ninguno	+ 13	

<i>Phaseolus vulgaris</i>	30		goteo de caucho			
Frijoles verdes <i>Phaseolus vulgaris</i>	15 - 30	100-50	Manguera de goteo de caucho	sí	+8,2	
Brócoli de tallo blando (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>)	15 - 30	100-50	Manguera de goteo de caucho	Sí, más raíces	+ 11	
Bok Choi (<i>Brassica rapa chinensis</i>) "Joi choi"	15 - 30	100-50	vertido en raíces	sí	+ 13	cultivo orgánico
Guisantes (<i>Pisum sativum</i>)	15 - 30	100-50	Manguera de goteo de caucho	ninguno	+13	Más raíces
Rosa (Rosa) "Athena")	18 - 40	95 - 30	Manguera de goteo de caucho	sí	+43	tallos más largos/hojas más brillantes en comparación con la referencia
Uvas (<i>Vitis vinifera</i>) "Tempranillo"	15-40	95 - 30	Manguera de goteo de caucho	Sí	+ 19	
Arándanos (<i>Vaccinia corymbosum</i>) "ventura"	5 - 35	86 - 18	Manguera de goteo de caucho	ND	+ 6 y + 8	La altura de planta es 1,3 m., edad de cultivo fue 3 años
Melón (<i>Cucumis melo</i>) "Piel de Sapo"	15-40	95-15	Manguera de goteo de caucho	Sí	+ 50	Más vigor (hojas más verdes y plantas más grandes)