

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 257**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07C 237/22 (2006.01)

C07K 5/062 (2006.01)

C07K 5/083 (2006.01)

C07K 5/103 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03816674 .0**

96 Fecha de presentación: **02.04.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1608674**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

54 Título: **Oligopéptidos, composición y utilización como elicitores de las defensas naturales de las plantas**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.05.2012

73 Titular/es:
**DE SANGOSSE SA
BONNEL
47480 PONT DU CASSE, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)**

72 Inventor/es:
**BESNARD, Olivier;
MARTINEZ, Jean y
CAVELIER, Florine**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 380 257 T3

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

DESCRIPCIÓN

Oligopéptidos, composición y utilización como elicitores de las defensas naturales de las plantas.

5 La presente invención se refiere a oligopéptidos utilizados como elicitores de las defensas naturales de las plantas contra los patógenos fúngicos y/o bacterianos y/o víricos y/o devastadores, por aplicación foliar, radicular o mediante inyección, y obtenidos por vía sintética orgánica o enzimática.

10 Las materias activas de las preparaciones fitosanitarias pueden tener una acción directa sobre los microorganismos, es el caso de las moléculas que inhiben ciertas vías metabólicas de las células o que afectan a su organización. Se trata generalmente de un tratamiento curativo.

15 En la lucha biológica, el tratamiento curativo está asegurado por la utilización de un agente antagonista o parasitario. Asimismo, se utiliza un microorganismo muy competitivo para la colonización del espacio cuando se trata de un tratamiento preventivo. Las materias activas de las preparaciones fitosanitarias pueden tener la propiedad de actuar indirectamente activando el sistema de defensa natural (SDN) de la planta. Esto se traduce por la sensibilización de la planta a un eventual ataque ulterior por parte del patógeno. En esta etapa, los genes responsables de la síntesis de las proteínas de defensa y de las fitoalexinas se encuentran activados, y los productos correspondientes se sintetizan a partir del primer contacto entre la célula vegetal y su agresor. Se habla entonces de un tratamiento
20 curativo por medio de elicitores.

Las reacciones de defensas pueden estar localizadas a nivel del sitio de ataque, se trata de una reacción de hipersensibilidad (HR) que provoca la muerte celular.

25 Pueden generalizarse y llegar a una resistencia sistémica adquirida (SAR). Globalmente, dos mecanismos de defensa concurren para frenar la propagación de la enfermedad. Por una parte, en el sitio de penetración del patógeno, las células infectadas se autodestruyen para retrasar su progresión (reacción de hipersensibilidad). Por otra parte, unas señales de alerta a las células próximas crean una zona de resistencia local adquirida en la que se acumulan numerosos compuestos de defensa. Unas señales se transmiten asimismo a la planta completa, llegando
30 así a una resistencia sistémica adquirida (SAR).

La particularidad novedosa de la presente invención se sitúa a nivel del nuevo modo de activación que es preventivo. En efecto, esta nueva clase de elicitores permite estimular un ataque de patógenos a nivel de las células vegetales. Estas últimas iniciarán un mecanismo natural de defensa que provocará una SAR, al menos una vez, lo cual permitirá prevenir aún más eficazmente el ataque.
35

Muy poca cantidad de elicitores basta para sensibilizar la membrana citoplásmica. Así, el umbral de detección de los elicitores por las plantas puede alcanzar un valor de 10^{-9} molar o incluso más bajo (Boller *et al.* 1995; Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.).
40

ELICITORES

Desde la introducción del término elicitor por Keen *et al.* (1972, Phytopathology), se ha demostrado que varias sustancias de estructuras químicas diversas poseen la propiedad de activar los sistemas naturales de defensa
45 (SDN) de las plantas. Son en particular los de origen abiótico y que están representados por los iones mercúricos, cúpricos, aluminicos, los ácidos araquidónico, fosfórico, salicílico, fúlvico y húmico. Existen asimismo unos elicitores bióticos de los cuales los más conocidos son:

Los oligosacáridos: pertenecen a los primeros elicitores en estar mejor caracterizados (Darvill y Albersheim (1984, Annu. Rev. Plant. Physiol)). Se componen de 4 clases: oligoglucanos, oligoquitina, oligoquitosano, oligogalacturónidos, de origen vegetal [Côté *et al.* (1994, Plant Mol. Biol)].
50

Oligoglucanos: el hepta- β -glucósido ramificado en posiciones (1,3-1,6) es el oligoglucósido más pequeño conocido por su acción elicitora. Se ha aislado a partir de *Phytophthora sojae*.
55

La quitina: es un polímero lineal de (1,4)- β -glucosamina que se encuentra en los hongos superiores, y representa el constituyente principal de sus micelos. La parte soluble de la quitina (liberada por la acción de las quitinasas vegetales), provoca la lignificación y la producción de fitoalexinas en algunas plantas [Pearce *et al.* (1982, Physiol. Plant Pathol), Ren *et al.* (1992, Plant Physiol)].
60

Los oligogalacturónidos: están probablemente liberados por la degradación de los homogalacturonanos (polisacáridos pécticos) tras un ataque del patógeno contra la planta. Estos homogalacturonanos están compuestos por residuos del ácido 1,4- α -D-galactosilurónico y entran en la composición de las paredes celulares de las plantas superiores [Côté *et al.* (1994, Plant Mol. Biol)].
65

Las enzimas:

Boland *et al.* (1997, FEBS Letters) han demostrado que el tratamiento de ciertas plantas por una celulasa comercial inicia la biosíntesis de productos volátiles a través de la vía de señal del ácido octadecanoico.

Klüsener *et al.* (1999, FEBS Letters) han estudiado las interacciones entre unas enzimas celulolíticas por un lado y un elicitor procedente de un cultivo de levadura (*Eschscholtzia californica*) por otro lado, con unas bicapas lipídicas. Han llegado a la conclusión de que los elicitores pueden despolarizar las membranas citoplásmicas, influir en los flujos iónicos a través de éstas e incluso perturbar sus organizaciones en ciertos casos. Algunos elicitores no necesitan por lo tanto reaccionar con las proteínas intracelulares para provocar unas respuestas de defensa en la planta. Esto explicaría el amplio espectro de ciertas moléculas.

Los polipéptidos y las proteínas:

Algunos glicopéptidos y/o oligosacáridos libres derivados de las glicoproteínas son activos en términos de elicitación [Anderson *et al.* (1989), Ebel *et al.* (1995, Can. J. Bot), Boller *et al.* (1995, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol)]. En las glicoproteínas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Coleman *et al.* 1992, Physiol Mol Plant Pathol) y de *Puccinia graminis f. sp. tritici* (Kogel *et al.* 1988, Physiol Mol Plant Pathol), las partes glucídicas son responsables de la actividad elicitora.

Un grupo de bacterias fitopatógenas de tipo gram-negativo produce unas proteínas elicitoras de la HR en plantas no hospedantes. Por ejemplo, *Erwinia amylovora* (Wei *et al.* 1992, Science; Baker *et al.* 1993, Plant Physiol) posee el gen *hrpN* que codifica para la producción de una harpina, y *Pseudomonas syringae pv. syringae* (He *et al.* 1993, Cell) segrega una harpina_{ss} que es el producto del gen *hrpZ*. La proteína (*HrpN*) procedente de *Erwinia amylovora* estimula el flujo extracelular de los cationes K⁺ y regula así las corrientes en las células de *Arabidopsis thaliana*.

Una proteína de 18 kDa segregada por una cepa de *Trichoderma virens* fue aislada y caracterizada por Hanson *et al.* (2000, Phytopatology). Esta proteína es capaz de inducir la biosíntesis de los productos de tipos terpenoides en el algodón.

Benhamou *et al.* (2000, Plant physiology) describen que una proteína (oligandrina) de bajo peso molecular, y procedente de *Pythium oligandrum* induciría una reacción de defensa en las plantas de tomates. Esta reacción limitaría la progresión de la enfermedad causada por el agente fitopatógeno *Phytophthora parasitica*.

La criptogeína es una proteína segregada por el hongo *Phytophthora cryptogea* (Blein *et al.* 1997, FEBS Letters) del cual se sirve para el transporte del esteroles. Es conocida asimismo por sus propiedades estimuladoras de la defensa de las plantas (Ricci *et al.* 1989, Eur. J. Biochem).

Oligopéptidos:

El hongo *Phytophthora sojae* produce una glicoproteína de la cual una parte (42 kDa) posee la propiedad elicitora. Se ha identificado incluso en la mitad C-terminal de esta glicoproteína, un oligopéptido de 13 aminoácidos que sería asimismo activo [(Parker *et al.* 1991, Mol Plant-Microbe Interact.), (Númeroberger *et al.* 1994, Cell), (Sacks *et al.* 1995, Mol Gen Genet.)]. Una estructura específica y una longitud mínima de la secuencia son esenciales para que esta oligopéptido conserve intacta su actividad. Unos fenómenos similares se han observado en el caso de la sistemina (Pearce *et al.* 1993, J. Biol Chem).

Varias especies de *Phytophthora* segregan unas proteínas extracelulares de bajo peso molecular (10 kDa) denominadas elicinas [(Ricci *et al.* 1992, Plant Pathol), (Kamoun *et al.* 1994, Appl Environ Microbiol), (Boissy *et al.* 1996, Structure)]. Estas moléculas son capaces de provocar unas reacciones de hipersensibilidad así como una resistencia sistémica adquirida [(Ricci *et al.* 1989, Eur. J. Biochem, 183 (3)), (Kamoun *et al.* 1993, Mol Plant-Microbe Interact)].

El péptido AVR9 *Cladosporium fulvum* es un elicitor (Wit *et al.* 1997, Mol Plant-Microbe Interact) de la reacción de hipersensibilidad en las plantas de tomate que poseen el gen de resistencia (MM-Cf9).

Aminoácidos:

Siegrist *et al.* (2000, Physiological and Molecular Plant pathology) han estudiado la capacidad de ciertos aminoácidos para iniciar la SAR en las plantas de tabaco. Trabajando con unas concentraciones de 10 mM, han observado los siguientes resultados:

El ácido β-aminobutírico es activo,

El ácido α-aminobutírico es poco activo,

El ácido γ-aminobutírico es totalmente inactivo.

ESPECIFICIDAD DE LA INVENCION

La especificidad de la invención se basa en la utilización de oligopéptidos helicoidales.

5 Los trabajos de Boland *et al.* (2000, Angew. Chem. In. Ed.) han demostrado que los peptaiboles inducen la biosíntesis de productos volátiles en algunas plantas. Esto se debería a su capacidad para formar unos canales iónicos en las membranas celulares. Estos tipos de acciones parecen ser los que iniciarían la estimulación de la defensa natural más fuerte posible. Se deberían en particular a una necrosis localizada de las células afectadas que inducen una alerta generalizada de las células adyacentes y de los tejidos.

10 Según Pedras *et al.* (1997, Phytochemistry), la destruxina B (oligodepsipéptido cíclico) segregada por el hongo *Alternaria brassicae* durante ataques de las crucíferas induciría la biosíntesis de una fitotoxina denominada sinalexina.

15 Bodo *et al.* (1998, Biochem. y Biophys. Acta) han estudiado la interacción de los peptaiboles con los liposomas [vesículas unilaminares anchas (LUV)]. Ha podido demostrar que el proceso principal implicado en el intercambio iónico a través de la membrana sería el modo "todo o nada". La formación de poros suficientemente anchos es por lo tanto esencial para la transición de los diferentes iones. Esto está asegurado por la formación de un complejo supramolecular entre un agregado de 3 a 4 monómeros peptídicos y las moléculas lipídicas.

20 Yeo *et al.* (2000, Tetrahedron Letters) han demostrado la actividad inhibitoria de las peptavirinas A y B contra el virus del mosaico del tabaco. Se ha observado una inhibición de 74 a 79% utilizando unas concentraciones de 10 µg/ml. Estos autores hablan de un mecanismo de acción directa de las peptavirinas en la inhibición del patógeno, pero no evocan en ningún caso la acción elicitora de estos peptaiboles.

25 La invención se refiere a la obtención de oligopéptidos helicoidales mediante síntesis peptídica. Las estructuras helicoidales de estos péptidos se alojan en el interior de las membranas celulares. Cuando varias de estas moléculas son insertadas juntas en la membrana, forman un canal o un poro, que altera la permeabilidad membranaria (despolarización). La originalidad de la presente invención es por lo tanto clarificar, optimizar y obtener estas estructuras moleculares que permiten con toda seguridad formar estos "poros".

SÍNTESIS DE POLÍMEROS DE AMINOÁCIDOS

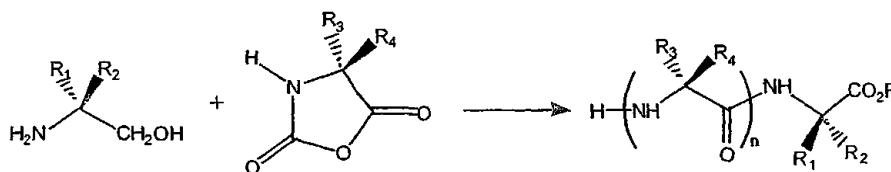
A-Polímeros obtenidos en mezclas

1. Obtención de poliaminoácido-alcoholes:

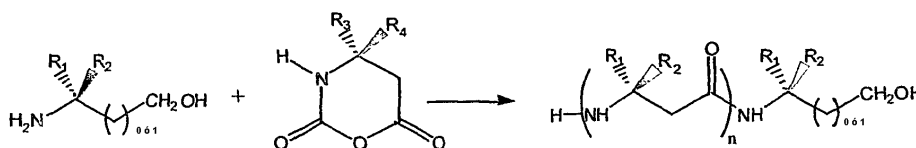
35 La reacción entre un aminoalcohol derivado de un aminoácido y de un N-carboxianhídrido derivado de un aminoácido, idéntico $R_1 = R_3$ y $R_2 = R_4$, o diferente, en un disolvente orgánico y bajo condiciones no esteoquiométricas, conduce a la formación de una mezcla de homopolímeros o de heteropolímeros respectivamente.

40 El procedimiento que permite la obtención de este tipo de producto se puede describir mediante el esquema de reacción siguiente:

45 a) A partir de α -aminoalcohol y de α -N-carboxianhídrido



50 b) A partir de α -aminoalcohol, β -aminoalcohol y β -N-carboxianhídrido (Cheng *et al.*, 2000, Organic letters)



En los dos casos a y b: R = H, alquilo, alquilo sustituido.

55

Según la configuración L o D de los aminoácidos utilizados:

- R₁ y R₃ = H, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales): R₁ y R₃ pueden ser idénticos;
- R₂ y R₄ = H, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales);
- n está comprendido entre 3 y 30.

Procedimiento de síntesis:

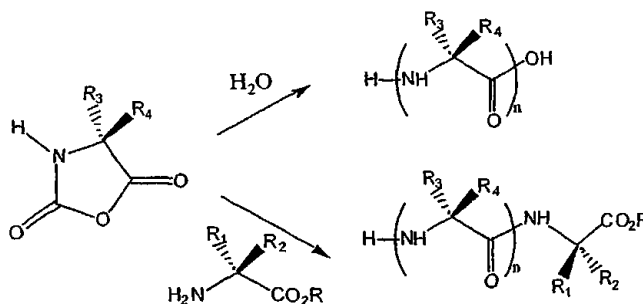
A 20 equivalentes de NCA (N-carboxianhídrido α o β) de aminoácido disuelto en el disolvente seleccionado (diclorometano, dimetilformamida, acetonitrilo, 20 ml de disolvente por equivalente de NCA de aminoácido α o β), se añade 1 equivalente de aminoalcohol (α o β). El medio de reacción se agita a temperatura ambiente durante 6 a 48 horas, según el aminoácido utilizado. El precipitado obtenido se filtra entonces.

Ejemplos

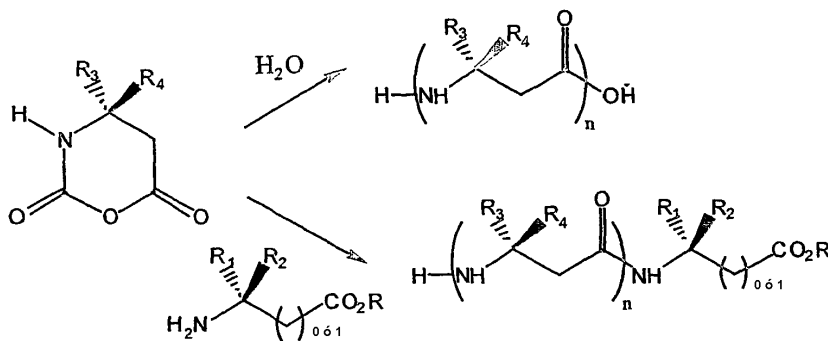
Alaninol	R ₁ = CH ₃	R ₂ = H
NCA de la alanina:	R ₃ = CH ₃	R ₄ = H
NCA del ácido glutámico	R ₃ = =CH ₂ CH ₂ COOBzl	R ₄ = H
NCA de la valina	R ₃ = CH(CH ₃) ₂	R ₄ = H

2- Obtención de poliaminoácidos:

a) A partir de α-aminoácido y de α-N-carboxianhídrido



b) A partir de α-aminoácido, β-aminoácido y β-N-carboxianhídrido



En los dos casos a y b: R = H, alquilo, alquilo sustituido.

Según la configuración L o D de los aminoácidos utilizados:

- R₁ y R₃ = H, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales). R₁ y R₃ pueden ser idénticos;
- R₂ y R₄ = H, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales). R₂ y R₄ pueden ser idénticos;

- n está comprendido entre 3 y 30.

Procedimiento de síntesis:

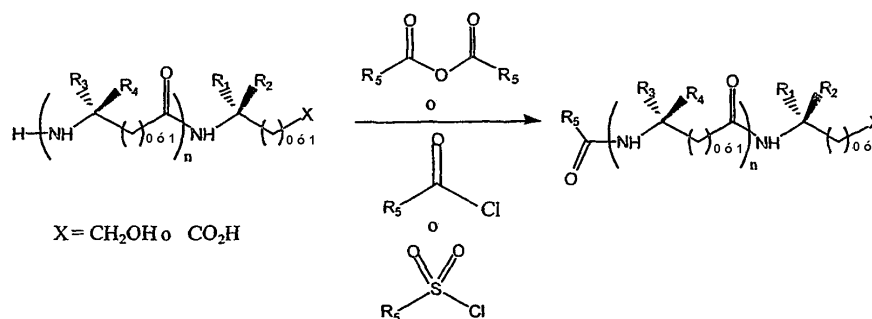
5 A 20 equivalentes de NCA (N-carboxianhídrido α o β) de aminoácido disuelto en el disolvente adecuado (diclorometano, dimetilformamida, acetonitrilo, 20 ml de disolvente por equivalente de NCA de aminoácido α o β), se añade 1 equivalente de agua.

10 La reacción se agita a temperatura ambiente durante 6 a 48 horas. Se filtra el precipitado obtenido.

Ejemplos

NCA de la alanina:	$R_3 = \text{CH}_3$	$R_4 = \text{H}$
NCA del ácido glutámico	$R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOBzl}$	$R_4 = \text{H}$
NCA de la valina	$R_3 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$R_4 = \text{H}$

15 3- Obtención de polímeros acilados:



R = H, alquilo, alquilo sustituido.

20 Según la configuración L o D de los aminoácidos utilizados:

- R_1 y $R_3 = \text{H}$, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales). R_1 y R_3 pueden ser idénticos;

25 - R_2 y $R_4 = \text{H}$, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales). R_2 y R_4 pueden ser idénticos;

- n está comprendido entre 3 y 30.

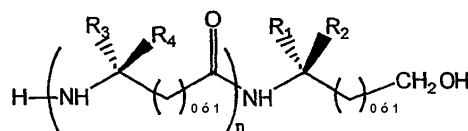
30 Procedimiento de acilación:

35 Se colocan 250 mg de productos a acilar en suspensión en 30 ml de dimetilformamida. Se añaden 15 equivalentes de agente acilante (anhídrido acético, anhídrido decanoico, etc.). La reacción se agita a temperatura ambiente (de 16 horas a 48 horas).

Después de la filtración, se obtiene un sólido blanco pulveroso.

B- Polímeros obtenidos puros y caracterizados

40 1. Poliaminoácido-alcoholes:

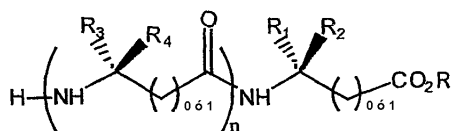


45 R = H, alquilo, alquilo sustituido.

Según la configuración L o D de los aminoácidos utilizados:

- R₁ y R₃ = H, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales). R₁ y R₃ pueden ser idénticos;
- R₂ y R₄ = H, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales). R₂ y R₄ pueden ser idénticos;
- n, comprendido entre 3 y 20, se define para cada compuesto.

2. Poliaminoácidos:

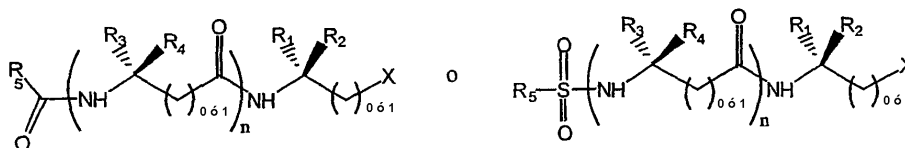


R = H, alquilo, alquilo sustituido.

Según la configuración L o D de los aminoácidos utilizados:

- R₁ y R₃ = H, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales). R₁ y R₃ pueden ser idénticos;
- R₂ y R₄ = H, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales). R₂ y R₄ pueden ser idénticos;
- n, comprendido entre 3 y 20, se define para cada compuesto.

3. Polímeros acetilados:



X = CH₂OH o CO₂H

R = H, alquilo, alquilo sustituido.

Según la configuración L o D de los aminoácidos utilizados:

- R₁ y R₃ = H, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales). R₁ y R₃ pueden ser idénticos;
- R₂ y R₄ = H, alquilo, alquilo sustituido o cadena lateral de los aminoácidos naturales o no naturales (protegida en el caso de cadenas funcionales). R₂ y R₄ pueden ser idénticos;
- n, comprendido entre 3 y 30, se define para cada compuesto.

Ejemplo de procedimiento de síntesis de los compuestos puros

La síntesis de los compuestos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 y 15 se lleva a cabo en fase sólida en estrategia Fmoc. La resina seleccionada es de tipo 2-clorotritilo (Senn, 1,8 mmoles/g).

Los acoplamientos se llevan a cabo en presencia de HOBT (2,5 equivalentes)/HBTU (2,5 equivalentes)/DIEA (4 equivalentes). El disolvente utilizado para la introducción de los Fmoc-aminoácidos es la dimetilformamida. El grupo Fmoc se escinde mediante una disolución de piperidina al 20% en dimetilformamida.

Injerto del aminoalcohol

La resina se agita a temperatura ambiente en presencia de Fmoc-aminoalcohol y de 6 equivalentes de piridina en una mezcla constituida por dimetilformamida y por diclorometano (1/1). Después de 16 h de reacción, se añade metanol a la resina y se agita la mezcla de reacción durante 30 minutos.

Después de la filtración, el porcentaje de carga de la resina se determina mediante análisis UV.

Los espectros de masa ESI se registraron sobre un espectrómetro de masas (Micromass Platform II) en modo electrospray.

5

Ejemplo de síntesis: compuesto 7

Acoplamiento-desprotección: a 1 g de resina precargada con alaninol (porcentaje de sustitución de 0,15 mmoles.g⁻¹) en suspensión en DMF, se añade una disolución de Fmoc-Ala en DMF y después una disolución de activación compuesta por una mezcla equimolar de HBTU y HOBt al 0,5 M y por 4 equivalentes de DIEA en DMF. La mezcla se agita durante 6 horas y después se trata mediante una disolución de piperidina al 20% en DMF. La resina se lava con una disolución de diclorometano y después con una disolución de éter.

Escisión de la resina: La resina se transvasa de la bandeja de reacción hacia un tubo de hemolisis al que se han añadido 4-5 ml de una disolución de TFA al 50% en diclorometano. Después de 10 minutos bajo agitación, la disolución se filtra y se lava la resina con diclorometano. El disolvente se evapora al vacío.

Los compuestos 8 a 15 se preparan repitiendo n veces la etapa de acoplamiento-desprotección.

- 20 **1: Ac-Ala_n-Ala-ol (1 < n < 10)**
ES: [M⁺H]⁺: 261,0, 402,5, 471,7, 544,4, 615,1, 686,4, 757,3, 808,9
- 2: Ac-Ala_n-Ala-ol (1 < n < 5)**
ES: [M + H]⁺: 373,2, 444,5 ET 515,3
- 25 **3: Ac-Ala_n-Ala-ol (1 < n < 8)**
ES: [M + H]⁺: 331,3, 402,2, 473,3, 544,6, 615,5, 685,3,
- 4: Dodecil-Ala_n-Ala-ol (1 < n < 4)**
ES: [M + H]⁺: 328,1, 400,0, 471,8, 542,0,
- 5: Ac - Ala_n-Ala-ol (1 < n < 9)**
ES: [M + H]⁺: 189,1, 260,0, 331,1, 402,0, 472,3, 544,5, 615,7, 686,5, 757,8
- 30 **6: H-Ala_n-Ala-ol (1 < n < 10)**
ES: [M + H]⁺: 147,0, 218,0, 288,6, 360,1, 431,1, 502,1, 573,3, 786,5,
- 7: H-Ala₁-Ala-ol (MW: 146)**
ES: [M + H]⁺: 147,0
- 8: H-Ala₂-Ala-ol (MW: 217)**
ES: [M + H]⁺: 218,0; [M + NA]⁺: 240,0; [2M + H]⁺: 434,8; [2M + NA]⁺: 457,4
- 35 **9: H-Ala₃-Ala-ol (MW: 288)**
ES: [M + H]⁺: 289,0
- 10: H-Ala₄-Ala-ol (MW: 359)**
ES: [M + H]⁺: 360,2; [M + NA]⁺: 382,2; [2M + H]⁺: 719,7; [2M + NA]⁺: 741,5
- 40 **11: H-Ala₅-Ala-ol (MW: 430)**
ES: [M + H]⁺: 431,4; [M + NA]⁺: 453,5; [2M + H]⁺: 861,3; [2M + N]⁺: 883,8
- 12: H-Ala₆-Ala-OH (MW: 501)**
ES: [M + H]⁺: 502,4; [M + N]⁺: 524,2
- 45 **13: H-Ala_n-Ala-OH (1 < n < 10)**
ES: [M + H]⁺: 160,9; 233,8; 303,1; 374,0; 445,2; 516,2; 587,3; 658,6; 729,3; 800,8
- 14: H-Ala₇-Ala-OH (MW: 572)**
ES: [M + H]⁺: 573,3 ; [M + NA]⁺: 595,4
- 15: H-Ala₈-Ala-OH (MW: 643)**
ES: [M + H]⁺: 644,7; [M + NA]⁺: 666,5; [2M + H]⁺: 1288,1

50

EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS OLIGOPÉPTIDOS

1- Selección de los marcadores bioquímicos sobre plantas enteras

55 a) Medición de la actividad peroxidásica (enzima endógena a las plantas)

Las peroxidasas tienen un sitio preponderante en los mecanismos de resistencia de las plantas.

60 Participan en la producción de especies activas del oxígeno tóxicas para los agentes patógenos y están implicadas en la formación de la reacción hipersensible. Intervienen asimismo en la modificación de la pared celular. Resulta de ello un aumento de la síntesis de la lignina y/o de suberina (barreras mecánicas). Asimismo, se realizan unos puentes covalentes entre las proteínas de la pared celular. Permiten la oxidación de fenoles en quinonas muy tóxicas y la incorporación de los flavonoides en las paredes (barrera química).

65 Teniendo en cuenta el papel primordial de las peroxidasas en la resistencia de las plantas, se ha utilizado la actividad de peroxidasa como marcador de la resistencia tras los tratamientos mediante elicitores.

5 Con el fin de dosificar las actividades peroxidásicas, las hojas se trituran en medio tampón citrato-monohidrógeno-fosfato-disódico. El extracto se pone después en presencia del gaiacol y de agua oxigenada. Se produce una reacción rápida: el gaiacol se transforma en tetragaiacol. La aparición del tetragaiacol en el medio permite calcular la actividad peroxidásica.

Las dosificaciones se llevan a cabo en este mismo tampón utilizando el gaiacol como sustrato. Los resultados están expresados en $\Delta DO/mn/g$ de materia fresca.

10 b) Medición de la actividad quitinásica

15 Con el fin de verificar que se han iniciado los mecanismos de resistencia, se ha dosificado asimismo una actividad enzimática que aparece en las situaciones de resistencia: la actividad quitinásica (enzima sintetizada a partir del ataque de los parásitos, que degrada la quitina, que constituye unas paredes de los hongos fitopatógenos).

Reacción colorimétrica utilizada: se utiliza un tampón de acetato:

20 Disolución de quitina + extracto enzimático + tampón acetato csp 0,5 ml (azur a 2 mg/ml) bruto 50 mM - (pH 5) (100 microlitros)

- incubación durante 30 minutos a 37°C, y bajo agitación continua.
- se detiene la reacción mediante adición de una disolución de HCl 1N
- medición colorimétrica con espectrofotómetro a 550 nm

25 La actividad quitinásica se expresa en $\Delta DO/mn/g$ de materia fresca.

Material vegetal utilizado

30 Todas las plantas ensayadas son plantas jóvenes obtenidas mediante sembrado o mediante esqueje. Se practican unas pulverizaciones de las formulaciones obtenidas a partir de oligopéptidos. Estas formulaciones contienen diversos humectantes o penetrantes capaces de vehicular la materia activa (oligopéptidos) hasta las células.

EFFECTOS ELICITORES DE OLIGOPÉPTIDOS

35 Los efectos elicitors de oligopéptidos de síntesis se han estudiado en varias familias de plantas entre las cuales se pueden citar: calabacín, melón, pepino, lechuga, trigo, vid.

Caso de los calabacines

40 Se han tratado unas plantas de calabacín de 3 semanas de edad mediante unos oligopéptidos. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla nº 1 (dibujo 1/2).

Según los resultados de dicha tabla, se observa que es el producto 6 el que posee la actividad elicitora más fuerte.

45 Admitiendo que el valor de 100% de actividad peroxidásica está representado por el producto 6, los productos 10 y 12 muestran una actividad de 50%. Esta diferencia de actividad podría tener su explicación en la diversidad de las estructuras químicas de estos productos.

50 Con grados diferentes, todos los demás productos han mostrado una actividad elicitora. Los resultados obtenidos indican que entre los productos ensayados, los aminoácidos libres son mucho menos activos con respecto a los oligopéptidos. El alaninol es el más activo de los residuos ensayados, seguido en el orden por la alanina, el Aib y por último el GABA.

55 Estos resultados expresan claramente el poder elicitor de los oligopéptidos.

Caso de la vid

60 Se han tratado unas plantas de vid de 3 semanas mediante unos oligopéptidos. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas nº II, III. (dibujo 1/2).

La correspondencia entre estructura y código de los productos sintetizados se indica en la tabla nº IV (dibujo 2/2).

EFFECTO DE PROTECCIÓN ANTI-PATOGENICA DE LOS OLIGOPÉPTIDOS

Ejemplo 1: Efecto contra la fusariosis del melón

5 La pulverización de oligopéptidos formulados sobre unas plantas de melón de siete días e inoculados por *fusarium oxysporum fsp melonis* cuatro días antes, permite obtener una protección contra el patógeno. Paralelamente, se pulverizaron las hojas con agua de un lote de plántulas control.

10 Diez días después de la inoculación, los síntomas aparecen únicamente en las plantas inoculadas tratadas con agua. Tres semanas después de la infección, estas plantas jóvenes infectadas se secan y mueren.

15 Las plantas inoculadas y tratadas con los oligopéptidos no presentan ningún síntoma antes de seis semanas y continúan desarrollándose normalmente después. Estos resultados expresan claramente el poder elicitor de estos oligopéptidos sobre la resistencia de las plantas de melón frente a *fusarium sp.*

Ejemplo 2: Efecto contra las enfermedades aéreas del melón

20 Pulverizando unos oligopéptidos sobre unas plantas jóvenes de melón, se observa un efecto similar de protección contra el *oidium*.

Cinco días después de la inoculación del patógeno, los síntomas aparecen sólo en las plantas tratadas con agua. Las tratadas con los oligopéptidos presentan sólo pocos o ningún síntoma y siguen desarrollándose normalmente tres semanas después de la inoculación.

25 Según las características de base de la invención, los oligopéptidos utilizados como elicitores:

- se obtienen por vía de síntesis orgánica o enzimática;
- tienen la particularidad de ser hetero y/o homopolímeros de aminoácidos, proteicos o no proteicos, que constituyen unas secuencias de dichos polímeros que se seleccionan por su propiedad para formar unas estructuras de tipo helicoidales o en forma de láminas β.

La composición según la invención puede:

- comprender por lo menos un oligopéptido que comprende por lo menos un aminoácido de tipo proteico, natural y/o sintético, y/o no proteico, natural y/o sintético;
- presentarse o bien en forma líquida, en particular de disolución acuosa, o bien en forma sólida, en particular de polvos, gránulos o de revestimiento de semillas. Los oligopéptidos utilizados pueden ser incorporados a un vehículo utilizado en agricultura de tipo humectante y penetrante.

La utilización de los oligopéptidos, según la invención, tiene por efecto reducir, cuando se aplican:

- a los cereales, en particular al trigo, al maíz y al arroz, el ataque de los oidios, de las septoriosis, de las royas, de las fusariosis, de las piriculariosis y de las enfermedades bacterianas y víricas;
- a los árboles frutales, en particular al peral y al manzano, el ataque de los didios, de la roña, de las moniliosis, de las enfermedades bacterianas y víricas tales como la "Sharka";
- a la vid, el ataque del oidio, del mildiú, del botritis, de las enfermedades de la madera, de las enfermedades telúricas y víricas tales como el raquitismo;
- al césped y en horticultura, los ataques de las pitiáceas, hongos con esclerotas, fusariosis, oidios, enfermedades bacterianas y víricas;
- a las oleaginosas, en particular a la soja, al girasol, al melón, a la zanahoria, a la coliflor y a la patata, el ataque de los oidios, de los mildiús, de las pitiáceas (*Phytophthora*, *Pythium*), de los hongos con esclerotas (*Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pyrenocheta*), de los hongos vasculares (*Fusarium*, *Verticillium*), de las enfermedades bacterianas y víricas.

REIVINDICACIONES

1. Utilización como elicitor de las defensas naturales de las plantas contra los patógenos fúngicos y/o bacterianos y/o víricos y/o devastadores, de un oligopéptido que presenta una de las estructuras siguientes:
- 5
- Ac-Ala_n-Ala-ol (1 < n < 10)
ES: [M + H]⁺: 147,0, 218,0, 288,6, 360,1, 431,1, 502,1, 573,3, 786,5
 - H-Ala₁-Ala-ol
ES: [M + H]⁺: 147,0

10

 - H-Ala₂-Ala-ol
ES: [M + H]⁺: 218; [M + Na]⁺: 240,0; [2M + H]⁺: 434,8; [2M * Na]⁺: 457,4
 - H-Ala₃-Ala-ol
ES: [M + H]⁺: 289,0
 - H-Ala₄-Ala-ol
ES: [M + H]⁺: 260,2; [M + Na]⁺: 382,2; [2M + H]⁺: 719,7; [2M + Na]⁺: 741,5

15

 - H-Ala₅-Ala-ol
ES: [M + H]⁺: 431,4; [M + Na]⁺: 453,5; [2M + H]⁺: 861,3; [2M + N]⁺: 883,8
 - H-Ala₆-Ala-OH
ES: [M + H]⁺: 502,4; [M + N]⁺: 524,2

20

 - H-Ala_n-Ala-OH (1 < n < 10)
ES: [M + H]⁺: 160,9; 233,8; 303,1; 374,0; 445,2; 516,2; 587,3; 658,6; 729,3; 800,8
2. Utilización según la reivindicación 1, para luchar contra el ataque de los oídios, de las septoriosis, de las royas, de las fusariosis, de las pirculariosis y de las enfermedades bacterianas y víricas en los cereales.
- 25
3. Utilización según la reivindicación 1, para luchar contra el ataque de los oídios, de la roña, de las moniliosis, de las enfermedades bacterianas y víricas en los árboles frutales.
- 30
4. Utilización según la reivindicación 1, para luchar contra el ataque de los oídios, del mildú, del bortritis, de las enfermedades de la madera, de las enfermedades telúricas y víricas en la vid.
- 35
5. Utilización según la reivindicación 1, para luchar contra los ataques de las pitiáceas, de los hongos con esclerotas, de las fusariosis, de los oídios o de las enfermedades bacterianas y víricas en el césped y en horticultura.
6. Utilización según la reivindicación 1, para luchar contra los ataques de los didios, del mildú, de las pitiáceas, de los hongos con esclerotas, de los hongos vasculares o de las enfermedades bacterianas y víricas en las oleaginosas.

Producto (3,5 mg/l)	Actividad peroxidásica (Δ DO/min/qMF)	% de actividad peroxidásica con respecto al producto más activo
7	99,16	28,49
8	94,6	27,18
9	112	32,18
10	194	55,74
11	102	29,31
12	175	50,28
6	348	100
Alaninol	69,46	19,96
Alanina	65,78	18,9
Aib	53,1	15,26
GABA	49,1	14,11
Humectante solo	73,5	13,95
Control no tratado	47,77	13,72

Tabla nº 1

Producto	Actividad peroxidásica	% de actividad peroxidásica con respecto al producto más activo
TNT	164,59	71,68
6	187,5	81,66
13	136,6	59,49
Producto de referencia	229,59	100

5

Tabla nº II

Producto	Actividad quitinásica	% de actividad quitinásica con respecto al producto más activo
TNT	17,059	26,12
6	45,4	80,94
13	65,3	100
Producto de referencia	56,09	85,89

10

Tabla nº III

Correspondencia entre estructura y código de los productos sintetizados

Producto	Estructura
1	Ac-(Ala) _n -Alaol
2	Ac-(Ala) _n -Alaol-Ac
3	Ac-(Ala) _n -Alaol
4	Dodecil-(Ala) _n -Alaol
5	Ac-(Ala) _n -Alaol
6	H-(Ala) _n -Alaol
7	H-Ala-Alaol
8	H-(Ala) ₂ -Alaol
9	H-(Ala) ₃ -Alaol
10	H-(Ala) ₄ -Alaol
11	H-(Ala) ₅ -Alaol
12	H-(Ala) ₆ -Alaol
13	H-(Ala) _n -COOH
14	H-(Ala) ₇ -Alaol
GABA	Ácido γ -aminobutírico
Aib	Ácido α -aminoisobutírico
T.N.T	Control no tratado

Tabla nº IV