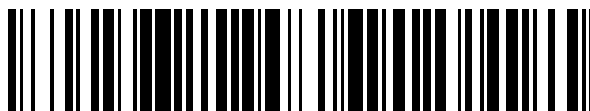


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 741**

51 Int. Cl.:

A01H 3/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01N 43/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10175325 .9**

96 Fecha de presentación: **10.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **2289310**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2011**

54 Título: **Utilización de antídotos para el aumento de la tolerancia de las plantas frente a agentes estresores abióticos**

30 Prioridad:
29.11.2005 DE 102005057250

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.06.2012

73 Titular/es:
Bayer CropScience AG
Alfred-Nobel-Straße 50
40789 Monheim, DE

72 Inventor/es:
Schulz, Arno;
Bartsch, Klaus;
Krämer, Hansjörg;
Hills, Martin;
Hacker, Erwin y
Rosinger, Chris

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

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).

ES 2 383 741 T3

DESCRIPCIÓN

Utilización de antidotos para el aumento de la tolerancia de las plantas frente a agentes estresores abióticos

5 El invento se refiere a la utilización de antidotos (en inglés "safener") para el aumento de la tolerancia de las plantas frente a agentes estresores abióticos tales como el calor y la sequedad mediante aumento de la expresión de proteínas endógenas para las plantas,

10 Es conocido que las plantas reaccionan contra condiciones naturales de estrés, tales como por ejemplo frío, calor, sequedad, lesión, infestación por patógenos (virus, bacterias, hongos, insectos), etc., pero también contra herbicidas con mecanismos de defensa específicos o inespecíficos [Pflanzenbiochemie [Bioquímica vegetal], páginas 393-462, editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlín, Oxford, Hans W. Heldt, 1996.; Biochemistry and Molecular Biology of Plants [Bioquímica y biología molecular de las plantas], páginas 1102-1203, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, coordinadores de edición Buchanan, Gruissem, Jones, 2000].

15 En las plantas, se conocen numerosas proteínas y los genes que las codifican, los/las cuales participan en reacciones de defensa frente a un estrés abiótico (p.ej. frío, calor, sequedad, sales). Éstos/as pertenecen parcialmente a cadenas de transducción de señales (p.ej. factores de transcripción, cinasas, fosfatasa) o dan lugar a una respuesta fisiológica de las células de las plantas (p.ej. transporte de iones, descontaminación de especies oxigenadas reactivas). A los genes de cadenas de señales de la reacción a un estrés abiótico pertenecen, entre otros, factores de transcripción de las clases DREB y CBF (Jaglo-Ottosen y colaboradores, 1998, Science 280: 104-106). En la reacción frente a un estrés salino participan fosfatasa de los tipos ATPK y MP2C. Además, en el caso de un estrés salino se activa frecuentemente la biosíntesis de osmolitos tales como prolina o sacarosa. Participan aquí p.ej. la sacarosa - sintasa y los transportadores de prolina (Hasegawa y colaboradores, 2000, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 51: 463-499). La defensa al estrés de las plantas contra el frío y la sequedad usa en parte los mismos mecanismos moleculares. Se conoce la acumulación de las denominadas proteínas abundantes en embriogénesis tardía, en inglés Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA-Proteins), a las que pertenecen como clase importante las deshidrinas (Ingram y Bartels, 1996, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 277-403, Close, 1997, Physiol Plant 100: 291-296). Se trata en este caso de chaperonas, que estabilizan a las vesículas, las proteínas y las estructuras membranales en plantas estresadas (Bray, 1993, Plant Physiol 103: 1035-1040). Además se efectúa frecuentemente una inducción de aldehído - deshidrogenasas que desintoxican a las especies oxigenadas reactivas (ROS, de Reactive Oxygenated Species) que resultan en el caso de un estrés oxidativo (Kirch y colaboradores, 2005, Plant Mol Biol 57: 315-332). Los factores de choque por calor, en inglés Heat Shock Factors (HSF), y las proteínas de choque por calor, en inglés Heat Shock Proteins (HSP) se activan en el caso de un estrés por calor y desempeñan aquí como chaperonas un cometido similar al de las deshidrinas en los casos de estrés por frío y por sequedad (Yu y colaboradores, 2005, Mol Cells 19: 328-333).

La mayor parte de los mecanismos moleculares descritos son activados mediante una inducción de la expresión de genes. De esta manera se establece la interesante posibilidad de caracterizar respuestas específicas al estrés de las plantas con ayuda del análisis del transcriptoma, p.ej. mediante un perfilamiento de la expresión de genes, del inglés Gene Expression Profiling (GEP) con microconjuntos de ADN (del inglés DNA Microarrays) o por técnicas comparables (Rensink y colaboradores, 2005, Genome 48: 598-605, Cheong y colaboradores, 2002, Plant Physiology 129: 661-677). De esta manera se pueden determinar unos modelos específicos de expresión de genes reactivos frente al estrés y se pueden comparar unos con otros.

45 Es conocido además que ciertas sustancias químicas pueden aumentar la tolerancia de las plantas frente a un estrés abiótico. Tales sustancias son aplicadas en tal caso ya sea mediante una desinfección de la simiente, por riego de las hojas o mediante tratamiento del suelo. Así, se ha descrito una elevación de la tolerancia frente a un estrés abiótico de las plantas cultivadas mediante tratamiento con elicitores de la resistencia adquirida sistémica (del inglés Systemic Acquired Resistance (SAR)) o con derivados del ácido abscísico (Schading y Wei, documento de solicitud de patente internacional WO-200028055, Abrams y Gusta, documento de patente de los EE.UU. US-5201931, Churchill y colaboradores, 1998, Plant Growth Regul 25: 35-45).

50 También en el caso de la utilización de fungicidas, en particular los del conjunto de las estrobilurinas, se observan unos efectos similares, que con frecuencia van acompañados también por un aumento del rendimiento de las cosechas (Draber y colaboradores, documento de patente alemana DE-3534948, Bartlett y colaboradores, 2002, Pest Manag Sci 60: 309).

60 Además, se describieron efectos de agentes reguladores del crecimiento sobre la tolerancia al estrés de las plantas cultivadas (Morrison y Andrews, 1992, J Plant Growth Regul 11: 113-117, documento de patente de la República Dominicana RD-259027). En el caso de un estrés osmótico se ha observado un efecto protector mediante una aplicación de osmolitos tales como p.ej. glicina-betaína o sus compuestos precursores bioquímicos, p.ej. derivados de colina (Chen y colaboradores, 2000, Plant Cell Environ 23: 609-618, Bergmann y colaboradores, documento DE-4103253). También se describió el efecto de agentes antioxidantes, tales como p.ej. naftoles y xantinas, para aumentar la tolerancia frente a un estrés abiótico en plantas (Bergmann y colaboradores, documento de patente de

la República Democrática Alemana DD-277832, Bergmann y colaboradores, documento DD-277835). Las causas moleculares del efecto frente a un estrés de estas sustancias son sin embargo ampliamente desconocidas.

Por consiguiente, es conocido que las plantas disponen de varios mecanismos endógenos de reacción, que pueden dar lugar a una defensa eficaz frente a los más diferentes organismos dañinos y/o frente a un estrés abiótico natural. Sin embargo, no se conocía hasta ahora una predicción acerca de cuáles reacciones de defensa pueden ser provocadas o moduladas deliberadamente mediante utilización de sustancias activas.

Existe por consiguiente una necesidad de un método para el descubrimiento planificado de activadores moleculares de mecanismos de defensa endógenos para las plantas frente a un estrés abiótico (tal como por ejemplo por calor, frío, sequedad, salinidad, así como carga con ácidos y bases) con lo cual se descubrieron nuevos tipos de sustancias activas, se identificaron nuevas propiedades de sustancias activas conocidas, pero que actúan de otro modo, o sino se pueden optimizar moléculas o estructuras directoras ya conocidas para la utilización como agentes inductores de los mecanismos de defensa endógenos para las plantas frente a agentes estresores abióticos.

Definiciones de los conceptos seguidamente utilizados

El concepto de "análisis de Blast" (Blast = acrónimo de Basic Local Alignment Search Tool = herramienta de búsqueda por alineación local básica), tal como aquí se utiliza, describe la utilización de adecuados programas de ordenador para la clasificación y para el descubrimiento de secuencias potencialmente homólogas (Altschul y colaboradores, J. Mol. Biol. 1990, 215: 403-410), efectuándose una comparación (por alineación, en inglés Alignment) entre una secuencia de búsqueda (en inglés query sequence) y todas las secuencias de uno o varios bancos de datos mediante preestablecimiento de una deseada coincidencia en forma de "un criterio de significancia" (en inglés scoring function = función de calificación), (R. Rauhut, Bioinformatik, páginas 38-107, editorial Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001).

El concepto de ADNc = „cDNA“ (complementary DNA = ADN complementario), tal como se utiliza aquí, describe una cadena individual de un ADN, que es complementaria con un ARN, y que es sintetizada *in vitro* mediante una transcripción inversa enzimática. El ADNc puede corresponder o bien a la longitud total del ARN, o sino puede constituir solamente una secuencia parcial del ARN que sirve como matriz.

El concepto de análisis de racimos (en inglés "cluster-analysis"), tal como aquí se utiliza, significa la recopilación de los datos individuales determinados mediante un programa de ordenador desarrollado para esto, siendo representados de modo recopilativo unos conjuntos de genes, que codifican proteínas con una función similar, o sino genes con un modelo de expresión similar. De esta manera, se consigue una minimización jerárquica del modelo complejo de datos, que se puede representar en forma de un dendrograma. El análisis de racimos hace posible la valoración clasificadora de los conjuntos de datos obtenidos, que va manifestamente más allá de la mera acumulación de datos sin relación entre sí.

Por los conceptos de chip de ADN (en inglés "DNA-Chip") y de microconjunto de ADN (en inglés "DNA-Microarray"), que se utilizan aquí de una manera sinónima, se designa a un soporte cuyo material de base se compone por ejemplo de vidrio o de nylon, a cuyo material de base están fijados unos fragmentos de ADN, pudiendo efectuarse la aplicación de los ADN por ejemplo mediante (a) un procedimiento fotolitográfico (el ADN es sintetizado directamente sobre el soporte del conjunto), (b) un procedimiento de microtransferencia por emborronado (en inglés "Microspotting") (los oligonucleótidos sintetizados externamente o los productos de la PCR (de "Polymerase Chain Reaction" = reacción en cadena de la polimerasa), se aplican sobre los soportes y se fijan por enlaces covalentes), o (c) mediante un procedimiento de microatomización (en inglés "Microspraying") (los oligonucleótidos sintetizados externamente o los productos de la PCR, se atomizan sobre los soportes sin contacto mediante una impresora de chorros de tinta) (R. Rauhut, Bioinformatik, S 197-199, Verlag Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001). Un chip de ADN, que representa a secuencias genómicas de un mecanismo, se designa como "chip de ADN genómico". La evaluación de los valores medidos, obtenidos con ayuda de estos chips de ADN, se designa como "análisis de chips de ADN".

El concepto de "hibridación de chips de ADN", tal como aquí se utiliza, significa el apareamiento de dos moléculas de ácidos nucleicos complementarios y monocatenarios, estando localizado uno de los participantes en las moléculas, que aparean las bases, como un ADN (ácido desoxirribonucleico) sobre el chip de ADN en una forma fijada preferiblemente por enlaces covalentes, mientras que el otro se presenta en forma del ARN (ácido ribonucleico) o del ADNc (ADN complementario) que corresponde a éste. La hibridación de los ácidos nucleicos fijados y no fijados se efectúa sobre el chip de ADN en una solución acuosa de un tampón, eventualmente en condiciones adicionalmente desnaturalizadoras, tal como por ejemplo en presencia de dimetilsulfóxido, a unas temperaturas de 30-60°C, de manera preferida de 40-50°C, de manera especialmente preferida a 45°C, durante 10-20 horas, de manera preferida durante 14-18 horas, de manera especialmente preferida durante 16 horas, mediante movimiento constante. Las condiciones de hibridación se pueden realizar de un modo constante por ejemplo en una estufa de hibridación. De un modo normalizado se realizan en una de tales estufas de hibridación unos movimientos de 60 rpm (revoluciones por minuto).

La secuencia de ácido nucleico, que se designa por el concepto de secuencia EST (Expressed Sequence Tag) tal como aquí se utiliza, significa una corta secuencia de 200-500 bases o pares de bases.

Los conceptos usados de un modo sinónimo "modelo de expresión", "modelo de inducción" o respectivamente "perfil de expresión", tal como aquí se utilizan, describen la expresión diferenciada en el tiempo y/o específica para ciertos tejidos del ARNm vegetal, siendo obtenido el modelo directamente mediante la intensidad producida de la señal de hibridación de los ARN obtenidos a partir de la planta, o de sus correspondientes ADNc, con ayuda de la tecnología de los chips de ADN. Los "valores de inducción" medidos se establecen mediante cálculo directo con las correspondientes señales, que se obtienen mediante utilización de un chip sinónimo mediante hibridación con una planta testigo no tratada / estresada.

El concepto de "estado de expresión" que se obtiene mediante el "perfilamiento de la expresión de genes" llevado a cabo, tal como aquí se utiliza, describe toda la actividad de transcripción determinada de genes celulares, que se mide con ayuda de un chip de ADN.

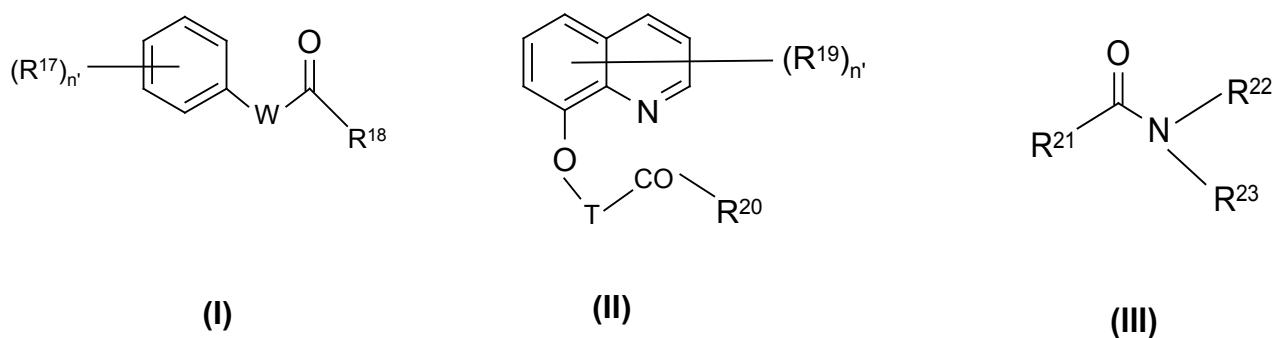
El concepto de "ARN total", tal como se utiliza aquí, describe la representancia, posible a causa del procedimiento de disgregación utilizado, de diferentes conjuntos de ARN endógenos para las plantas, que se pueden presentar en una célula de planta, tales como por ejemplo un ARNr (ARN ribosomal) citoplasmático, un ARNt (ARN de transferencia) citoplasmático, un ARNm (ARN mensajero) citoplasmático, así como sus respectivos precursores nucleares, un ARNct (ARN cloroplastídico) y un ARNmt (ARN mitocondrial), pero él abarca también unas moléculas de ARN, que pueden proceder de organismos exógenos, tal como por ejemplo de virus o bacterias, o de hongos parasitantes.

El concepto de "plantas útiles", tal como aquí se utiliza, designa a plantas cultivadas, que se emplean como plantas para la obtención de alimentos, de piensos o para finalidades técnicas.

El concepto de "antídoto", tal como aquí se utiliza, designa a un compuesto químico que es de origen no endógeno de las plantas, y que suprime o disminuye las propiedades fitotóxicas de un plaguicida frente a las plantas útiles, sin que se disminuya esencialmente el efecto plaguicida frente a organismos dañinos, tales como, por ejemplo, malezas, bacterias, virus y hongos.

Los antídotos, que junto a su función conocida propiamente, contribuyen asimismo al aumento de la tolerancia frente a agentes estresores abióticos, se escogen de manera preferida entre el conjunto seguidamente definido, pudiendo efectuarse la elección de manera diferente dependiendo de cuál sea el agente estresor abiótico, de la utilización de solamente un único antídoto, o sino de varios antídotos tomados de los mismos o diferentes conjuntos.

a) Compuestos de las fórmulas (I) hasta (III),

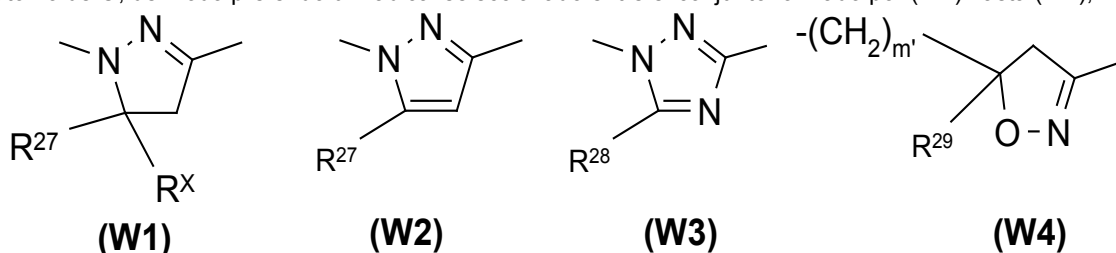


teniendo los símbolos e índices los siguientes significados:

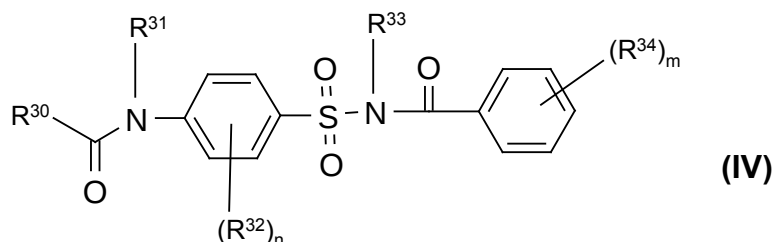
n' es un número natural de 0 a 5, de modo preferido de 0 a 3;

T es una cadena de alcano (C_1 ó C_2)-dílo, que está sin sustituir o sustituida con uno o dos radicales alquilo (C_1 - C_4) o con [alcoxi (C_1 - C_3)]-carbonilo;

W es un radical heterocíclico divalente sin sustituir o sustituido, seleccionado entre el conjunto de los heterociclos con anillos de cinco miembros parcialmente insaturados o aromáticos con 1 a 3 heteroátomos de anillo del tipo de N u O, estando contenidos en el anillo por lo menos un átomo de N y a lo sumo un átomo de O, de modo preferido un radical seleccionado entre el conjunto formado por (W1) hasta (W4),

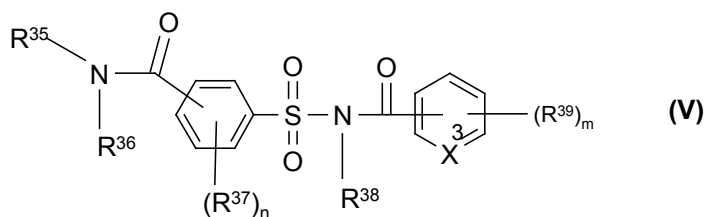


- m' es 0 ó 1;
 R^{17} , R^{19} son, iguales o diferentes, halógeno,
 alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4), nitro o haloalquilo (C_1-C_4);
 5 R^{18} , R^{20} son, iguales o diferentes, OR^{24} , SR^{24} ó $NR^{24}R^{25}$ o un heterociclo saturado o insaturado de 3 a 7 miembros, con por lo menos un átomo de N y con hasta 3 heteroátomos, preferiblemente tomado del conjunto formado por O y S, que está unido a través del átomo de N con el grupo carbonilo existente en (II) o respectivamente (III) y que está sin sustituir o sustituido con radicales seleccionados entre el conjunto formado por alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4), o fenilo eventualmente sustituido,
 10 R^{24} de modo preferido un radical de la fórmula OR^{24} , NHR^{25} ó $N(CH_3)_2$, en particular de la fórmula OR^{24} , es hidrógeno o un radical hidrocarbilo alifático sin sustituir o sustituido, de modo preferido con 1 a 18 átomos de C en total;
 R^{25} es hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_6) o fenilo sustituido o sin sustituir;
 15 R^X es H, alquilo (C_1-C_8), haloalquilo (C_1-C_8), alcoxi (C_1-C_4)-alquilo (C_1-C_4), ciano o $COOR^{26}$, en que R^{26} es hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), haloalquilo (C_1-C_8), alcoxi (C_1-C_4)-alquilo (C_1-C_8), hidroxialquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_{12}) o tri-alquil (C_1-C_4)-sililo;
 R^{27} , R^{28} , R^{29} son, iguales o diferentes, hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), haloalquilo (C_1-C_8), cicloalquilo (C_3-C_{12}) o fenilo sustituido o sin sustituir;
 20 R^{21} es alquilo (C_1-C_4), haloalquilo (C_1-C_4), alqueno (C_2-C_4), haloalqueno (C_2-C_4), cicloalquilo (C_3-C_7), de modo preferido diclorometilo;
 R^{22} , R^{23} son, iguales o diferentes, hidrógeno, alquilo (C_1-C_4), alqueno (C_2-C_4), alquino (C_2-C_4), haloalquilo (C_1-C_4), haloalqueno (C_2-C_4), alquil (C_1-C_4)-carbamoil-alquilo (C_1-C_4), alqueno (C_2-C_4)-carbamoil-alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4)-alquilo (C_1-C_4), dioxolanil-alquilo (C_1-C_4), tiazolilo, furilo, furil-alquilo, tienilo, piperidilo,
 25 fenilo sustituido o sin sustituir, o R^{22} y R^{23} forman en común un anillo heterocíclico sustituido o sin sustituir, de modo preferido un anillo de oxazolidina, tiazolidina, piperidina, morfolina, hexahidropirimidina o benzoxazina;
 b) uno o varios compuestos seleccionados entre el conjunto formado por:
 30 anhídrido de ácido 1,8-naftálico,
 difenilmetoxiacetato de metilo,
 1-(2-clorobencil)-3-(1-metil-1-feniletil)urea (cumilurón),
 fosforoditioato de O,O-dietil S-2-etiltioetilo (disulfotón),
 metilcarbamato de 4-clorofenilo (mefenato),
 35 fosforotioato de O,O-dietil-O-fenilo (dietolato),
 ácido 4-carboxi-3,4-dihidro-2H-1-benzopirano-4-acético (CL-304415, CAS-Nº de reg: 31541-57-8),
 cianometoxiimino(fenil)acetónitrilo (ciometrinilo),
 1,3-dioxolan-2-ilmetoxiimino(fenil)acetónitrilo (oxabetrinilo),
 O-1,3-dioxolan-2-ilmetiloxima de 4'-cloro-2,2,2-trifluoro-acetofenona (fluxofenim),
 40 4,6-dicloro-2-fenilpirimidina (fenclorim),
 2-cloro-4-trifluorometil-1,3-tiazol-5-carboxilato de bencilo (flurazol),
 2-diclorometil-2-metil-1,3-dioxolano (MG-191),
 N-(4-metilfenil)-N'-(1-metil-1-feniletil)urea (dimrón),
 ácido (2,4-diclorofenoxi)acético (2,4-D),
 45 ácido (4-clorofenoxi)acético,
 ácido (R,S)-2-(4-cloro-o-toliloxi)propiónico (mecoprop),
 ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butírico (2,4-DB),
 ácido (4-cloro-o-toliloxi)acético (MCPA),
 ácido 4-(4-cloro-o-toliloxi)butírico,
 50 ácido 4-(4-clorofenoxi)butírico,
 ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba),
 3,6-dicloro-2-metoxibenzoato de 1-(etoxicarbonil)etilo (lactidicloro)
 así como sus sales y ésteres, de modo preferido de (C_1-C_8);
 55 c) N-acil-sulfonamidas de la fórmula (IV) y sus sales,



en las que

- R^{30} significa hidrógeno, un radical hidrocarbilo, un radical hidrocarbilo, un radical hidrocarbilo o un radical heterociclilo, que preferiblemente está unido a través de un átomo de C, realizándose que cada uno de los 4 radicales mencionados en último término está sin sustituir o sustituido con uno o varios radicales, iguales o diferentes, seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, ciano, nitro, amino, hidroxilo, carboxi, formilo, carboxamido, sulfonamido y radicales de la fórmula $-Z^a-R^a$, realizándose que cada parte de hidrocarbilo tiene de modo preferido de 1 a 20 átomos de C y que un radical R^{30} que contiene C, tiene, inclusive los sustituyentes, de modo preferido de 1 a 30 átomos de C;
- R^{31} significa hidrógeno o alquilo (C_1-C_4), de modo preferido hidrógeno, o R^{30} y R^{31} en común con el grupo de la fórmula $-CO-N-$ significa el radical de un anillo saturado o insaturado de 3 a 8 miembros;
- los R^{32} iguales o diferentes, significan halógeno, ciano, nitro, amino, hidroxilo, carboxi, formilo, $CONH_2$, SO_2NH_2 o un radical de la fórmula $-Z^b-R^b$;
- R^{33} significa hidrógeno o alquilo (C_1-C_4), de modo preferido H;
- los R^{34} iguales o diferentes, significan halógeno, ciano, nitro, amino, hidroxilo, carboxi, CHO, $CONH_2$, SO_2NH_2 o un radical de la fórmula $-Z^c-R^c$;
- R^a significa un radical hidrocarbilo o un radical heterociclilo, estando cada uno de los dos radicales mencionados en último término sin sustituir o sustituido con uno o varios radicales iguales o diferentes, seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, ciano, nitro, amino, hidroxilo, mono- y di-[alquil (C_1-C_4)]-amino, o un radical alquilo, en el que varios, de modo preferido 2 ó 3, grupos CH_2 no contiguos están reemplazados en cada caso por un átomo de oxígeno;
- R^b, R^c iguales o diferentes, significan un radical hidrocarbilo o un radical heterociclilo, realizándose que cada uno de los dos radicales mencionados en último término está sin sustituir o sustituido con uno o varios radicales, iguales o diferentes, seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, ciano, nitro, amino, hidroxilo, fosforilo, halógeno-alcoxi (C_1-C_4), mono- y di-[alquil (C_1-C_4)]-amino, o un radical alquilo, en el que varios, de modo preferido 2 ó 3, grupos CH_2 no contiguos están reemplazados en cada caso por un átomo de oxígeno;
- Z^a significa un grupo divalente de las fórmulas $-O-$, $-S-$, $-CO-$, $-CS-$, $-CO-O-$, $-CO-S-$, $-O-CO-$, $-S-CO-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR^*-$, $-CO-NR^*-$, $-NR^*-CO-$, $-SO_2-NR^*-$ ó $-NR^*-SO_2-$, realizándose que el enlace indicado a la derecha del respectivo grupo divalente es el enlace con el radical R^a , y realizándose que los R^* en los 5 radicales mencionados en último término, independientemente unos de otros, significan en cada caso H, alquilo (C_1-C_4) o haloalquilo (C_1-C_4);
- Z^b, Z^c independientemente uno de otro, significan un enlace directo o un grupo divalente de las fórmulas $-O-$, $-S-$, $-CO-$, $-CS-$, $-CO-O-$, $-CO-S-$, $-O-CO-$, $-S-CO-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR^*-$, $-SO_2-NR^*-$, $-NR^*-SO_2-$, $-CO-NR^*-$ o $-NR^*-CO-$, realizándose que el enlace indicado a la derecha del respectivo grupo divalente es el enlace con el radical R^b ó R^c respectivamente, y realizándose que los R^* en los 5 radicales mencionados en último término, independientemente unos de otros, significan en cada caso H, alquilo (C_1-C_4) o haloalquilo (C_1-C_4);
- n significa un número entero de 0 a 4, de modo preferido 0, 1 ó 2, en particular 0 ó 1, y
- m significa un número entero de 0 a 5, de modo preferido 0, 1, 2 ó 3, en particular 0, 1 ó 2;
- d) amidas de ácidos acilsulfamoilbenzoicos de la fórmula general (V), eventualmente también en forma de una sal



en las que

- X^3 significa CH ó N;
- R^{35} significa hidrógeno, heterociclilo o un radical hidrocarbilo, realizándose que los dos radicales mencionados en último término están sustituidos eventualmente con uno o varios radicales, iguales o diferentes, seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, ciano, nitro, amino, hidroxilo, carboxi, CHO, $CONH_2$, SO_2NH_2 y Z^a-R^a ;
- R^{36} significa hidrógeno, hidroxilo, alquilo (C_1-C_6), alquenoilo (C_2-C_6), alquinoilo (C_2-C_6), alcoxi (C_1-C_6), alquenoil (C_2-C_6)-oxi, realizándose que los cinco radicales mencionados en último término están sustituidos eventualmente con uno o varios radicales, iguales o diferentes, seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, hidroxilo, alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4) y alquil (C_1-C_4)-tio, o
- R^{35} y R^{36} en común con el átomo de nitrógeno que los lleva, significan un anillo saturado o insaturado de 3 a 8 miembros;
- R^{37} significa halógeno, ciano, nitro, amino, hidroxilo, carboxi, CHO, $CONH_2$, SO_2NH_2 ó Z^b-R^b
- R^{38} significa hidrógeno, alquilo (C_1-C_4), alquenoilo (C_2-C_4) o alquinoilo (C_2-C_4);
- R^{39} significa halógeno, ciano, nitro, amino, hidroxilo, carboxi, fosforilo, CHO, $CONH_2$, SO_2NH_2 ó Z^c-R^c
- R^a significa un radical alquilo (C_2-C_{20}), cuya cadena de carbonos está interrumpida una vez o múltiples veces por átomos de oxígeno, o significa heterociclilo o un radical hidrocarbilo, realizándose que los dos radicales

mencionados en último término están sustituidos eventualmente con uno o varios radicales, iguales o diferentes, seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, ciano, amino, hidroxilo, mono- y di-[alquil (C₁-C₄)]-amino;

R^b, R^c

iguales o diferentes, significan un radical alquilo (C₂-C₂₀), cuya cadena de carbonos está interrumpida una vez o múltiples veces por átomos de oxígeno, o significa heterociclilo o un radical hidrocarbilo, realizándose que los dos radicales mencionados en último término están sustituidos eventualmente con uno o varios radicales, iguales o diferentes, seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, ciano, nitro, amino, hidroxilo, fosforilo, haloalcoxi (C₁-C₄), mono- y di-[alquil (C₁-C₄)]-amino;

Z^a

significa una unidad divalente seleccionada entre el conjunto formado por O, S, CO, CS, C(O)O, C(O)S, SO, SO₂, NR^d, C(O)NR^d ó SO₂NR^d;

Z^b, Z^c

iguales o diferentes, significan un enlace directo o una unidad divalente seleccionada entre el conjunto formado por O, S, CO, CS, C(O)O, C(O)S, SO, SO₂, NR^d, SO₂NR^d ó C(O)NR^d;

R^d

significa hidrógeno, alquilo (C₁-C₄) o haloalquilo (C₁-C₄);

n

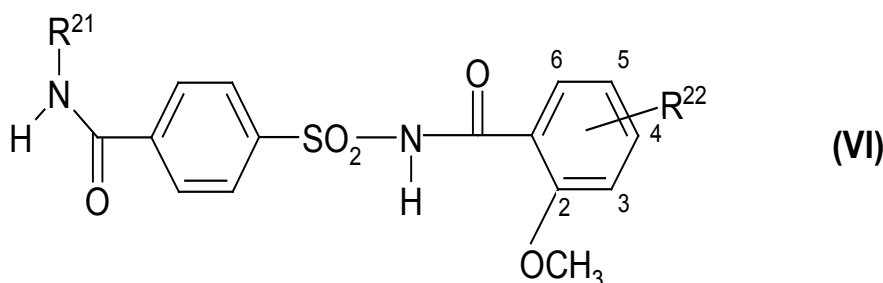
significa un número entero de 0 a 4; y

m

para el caso de que X represente CH, significa un número entero de 0 a 5, y para el caso de que X represente N, significa un número entero de 0 a 4;

e)

Compuestos del tipo de las amidas de ácidos acilsulfamoílbenczoicos, p.ej. de la siguiente fórmula (VI), que se conocen p.ej. a partir del documento WO 99/16744



p.ej. aquellos en los que

R²¹ es = ciclo-propilo y R²² es = H (S3-1 = 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzóil)bencenosulfonamida),

R²¹ = ciclo-propilo y R²² es = 5-Cl (S3-2),

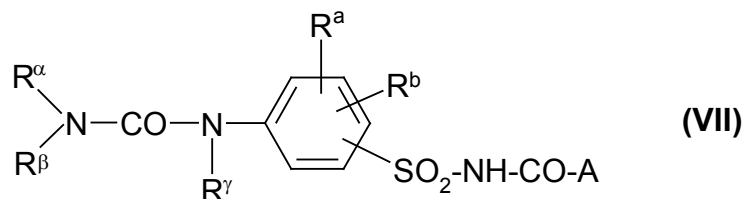
R²¹ es = etilo y R²² es = H (S3-3),

R²¹ es = iso-propilo y R²² es = 5-Cl (S3-4) y

R²¹ es = iso-propilo y R²² es = H (S3-5);

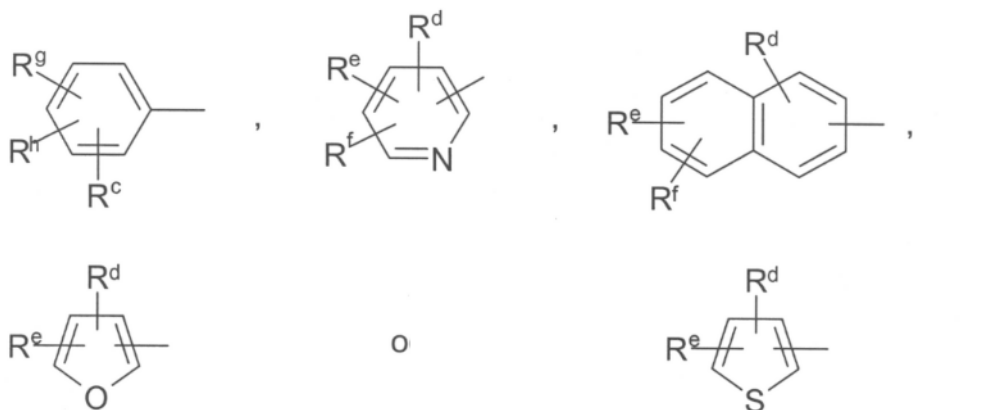
f)

Compuestos del tipo de las N-acilsulfamoílfenilureas de la fórmula (VII), que se conocen p.ej. a partir del documento de solicitud de patente europea EP-A-365484,

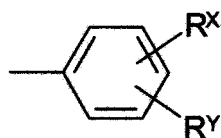


en los que

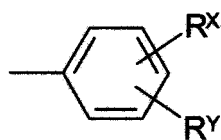
A representa un radical seleccionado entre el conjunto formado por



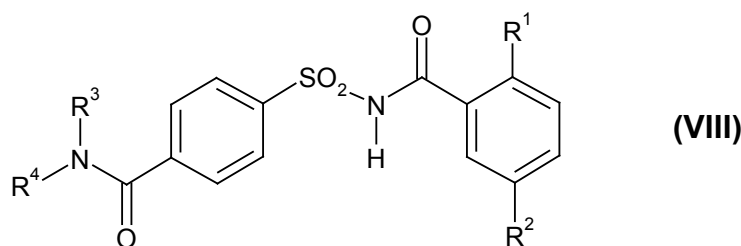
R^a y R^b independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , alquenilo C_3-C_6 , alquinilo C_3-C_6 ,



o con alcoxi C_1-C_4 o con alcoxi C_1-C_4 sustituido con



- 5 , o
- R^a y R^b en común representan un puente de alquileo C_4-C_6 o un puente de alquileo C_4-C_6 interrumpido por oxígeno, azufre, SO, SO_2 , NH o -N(alquilo C_1-C_4)-,
- R^c representa hidrógeno o alquilo C_1-C_4 ,
- 10 R^a y R^b independientemente uno de otro, representan hidrógeno, halógeno, ciano, nitro, trifluorometilo, alquilo C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_4 , alquil C_1-C_4 -tio, alquil C_1-C_4 -sulfinilo, alquil C_1-C_4 -sulfonilo, $-COOR^j$, $-CONR^kR^m$, $-COR^n$, $-SO_2NR^kR^m$ o $-OSO_2$ -alquilo C_1-C_4 , o R^a y R^b en común representan un puente de alquileo C_3-C_4 , que puede estar sustituido con halógeno o alquilo C_1-C_4 , o un puente de alquenileno C_3-C_4 , que puede estar sustituido con halógeno o alquilo C_1-C_4 , y
- 15 R^g y R^h independientemente uno de otro, representan hidrógeno, halógeno, alquilo C_1-C_4 , trifluorometilo, metoxi, metiltio o $-COOR^j$, representando
- R^c hidrógeno, halógeno, alquilo C_1-C_4 o metoxi,
- R^d hidrógeno, halógeno, alquilo C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_4 , alquil C_1-C_4 -tio, alquil C_1-C_4 -sulfinilo, alquil C_1-C_4 -sulfonilo, $-COOR^j$ o $-CONR^kR^m$,
- 20 R^e hidrógeno, halógeno, alquilo C_1-C_4 , $-COOR^j$, trifluorometilo o metoxi, o R^d y R^e representan en común un puente de alquileo C_3-C_4 ,
- R^f hidrógeno, halógeno o alquilo C_1-C_4 , representando
- R^x y R^y independientemente uno de otro, hidrógeno, halógeno, alquilo C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_4 , alquil C_1-C_4 -tio, $-COOR^j$ trifluorometilo, nitro o ciano, representando
- 25 R^j , R^k y R^m independientemente uno de otro, hidrógeno o alquilo C_1-C_4 , representando
- R^k y R^m en común un puente de alquileo C_4-C_6 o un puente de alquileo C_4-C_6 interrumpido por oxígeno, NH o -N(alquilo C_1-C_4)-, y significando
- R^n alquilo C_1-C_4 , fenilo, o fenilo sustituido con halógeno, alquilo C_1-C_4 , metoxi, nitro o trifluorometilo, de modo preferido
- 30 1-[4-(N-2-metoxibenzoílsulfamoíl)fenil]-3-metilurea,
1-[4-(N-2-metoxibenzoílsulfamoíl)fenil]-3,3-dimetilurea,
1-[4-(N-4,5-dimetilbenzoílsulfamoíl)fenil]-3-metilurea,
1-[4-(N-naftoílsulfamoíl)fenil]-3,3-dimetilurea,
- 35 g) Compuestos del tipo de las amidas de ácidos acilsulfamoílbenczoicos de la fórmula (VIII), conocidos a partir del documento EP-A-1019368, eventualmente también en forma de sales,



en que

- 5 R^1 significa metilo, metoxi o trifluorometoxi;
 R^2 significa hidrógeno, cloro o metilo;
 R^3 significa hidrógeno, etilo o propargilo;
 R^4 significa etilo, ciclopropilo, iso-propilo o propargilo,

10 R^3 y R^4 forman en común el grupo $(CH_2)_4$,

inclusive los estereoisómeros y las sales habituales en la agricultura.

15 Los compuestos de la fórmula (I) son conocidos, p.ej., a partir de los documentos de solicitudes de patentes europeas EP-A-0 333 131 (= documento de patente surafricana ZA-89/1960), EP-A-0 269 806 (= documento de patente de los EE.UU. US-A-4.891.057), EP-A-0 346 620 (= documento de solicitud de patente australiana AU-A-89/34951), y de los documentos EP-A-0 174 562, EP-A-0 346 620 (= documento WO-A-91/08.202), WO-A-91/07 874 ó WO-A 95/07 897 (= documento ZA 94/7120) y la bibliografía allí citada, o se pueden preparar de acuerdo con, o de una manera análoga a la de, los procedimientos allí descritos.

20 Los compuestos de la fórmula (II) son conocidos a partir de los documentos EP-A-0 086 750, EP-A-0 94349 (= documento US-A-4.902.340), EP-A-0 191736 (= documento US-A-4.881.966) y EP-A-0 492 366 y la bibliografía allí citada o se pueden preparar de acuerdo con, o de una manera análoga a la de, los procedimientos allí descritos. Algunos compuestos se describen además en los documentos EP-A-0 582 198 y WO 2002/34048.

25 Los compuestos de la fórmula (III) son conocidos a partir de numerosas solicitudes de patentes, por ejemplo a partir de los documentos US-A-4.021.224 y US-A-4.021.229

Los compuestos del conjunto (b) son conocidos además a partir del documento de solicitud de patente china CN-A-87/102 789, del documento EP-A-365484 así como de la cita "The Pesticide Manual", The British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry, 11ª edición, Farnham 1997.

30 Los compuestos del conjunto (c) se describen en el documento WO-A-97/45016, los del conjunto (d) se describen en el documento WO-A-99/16744, los del conjunto B (e) se describen en el documento EP-A-365484 y los del conjunto (g) se describen en el documento EP-A-1019368.

35 Los documentos citados contienen datos detallados acerca de procedimientos de preparación y materiales de partida y mencionan compuestos preferidos. A estos documentos se hace expresamente referencia, ellos se consideran por citación como parte constituyente de esta memoria descriptiva.

40 Se prefieren compuestos de las fórmulas (I) y/o (II), conocidos como antídotos, en los que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

45 R^{24} es hidrógeno, alquilo (C_1 - C_{18}), cicloalquilo (C_3 - C_{12}), alquenilo (C_2 - C_8) y alquinilo (C_2 - C_{18}), pudiendo los grupos que contienen C estar sustituidos con uno o varios, de modo preferido hasta tres, radicales R^{50} , los R^{50} son, iguales o diferentes, halógeno, hidroxilo, alcoxi (C_1 - C_8), alquil (C_1 - C_8)-tio, alquenil (C_2 - C_8)-tio, alquinil (C_2 - C_8)-tio, alquenil (C_2 - C_8)-oxi, alquinil (C_2 - C_8)-oxi, cicloalquilo (C_3 - C_7), cicloalcoxi (C_3 - C_7), ciano, mono- y di-(alquil (C_1 - C_4))-amino, carboxi, alcoxi (C_1 - C_8)-carbonilo, alquenil (C_2 - C_8)-oxicarbonilo, alquil (C_1 - C_8)-tiocarbonilo, alquinil (C_2 - C_8)-oxicarbonilo, alquil (C_1 - C_8)-carbonilo, alquenil (C_2 - C_8)-carbonilo, alquinil (C_2 - C_8)-carbonilo, 1-(hidroxiimino)-alquilo (C_1 - C_6), 1-[alquil (C_1 - C_4)-imino]-alquilo (C_1 - C_4), 1-[alcoxi (C_1 - C_4)-imino]-alquilo (C_1 - C_6), alquil (C_1 - C_8)-carbonilamino, alquenil (C_2 - C_8)-carbonilamino, alquinil (C_2 - C_8)-carbonilamino, aminocarbonilo, alquil (C_1 - C_8)-aminocarbonilo, di-(alquil (C_1 - C_6))-amino-carbonilo, alquenil (C_2 - C_8)-aminocarbonilo, alquinil (C_2 - C_8)-aminocarbonilo, alcoxi (C_1 - C_8)-carbonilamino, alquil (C_1 - C_8)-aminocarbonilamino, alquil (C_1 - C_6)-carboniloxi, que está sin sustituir o sustituido con R^{51} , alquenil (C_2 - C_6)-carboniloxi, alquinil (C_2 - C_6)-carboniloxi, alquil (C_1 - C_8)-sulfonilo, fenilo, fenil-alcoxi (C_1 - C_6), fenil-alcoxi (C_1 - C_6)-carbonilo, fenoxi, fenoxi-alcoxi (C_1 - C_6), fenoxi-alcoxi (C_1 - C_6)-carbonilo, fenilcarboniloxi, fenilcarbonilamino, fenil-alquil (C_1 - C_6)-carbonilamino, estando los 9 radicales mencionados en último término sin sustituir o sustituidos una vez o múltiples veces, preferiblemente hasta tres veces, con radicales R^{52} en el anillo de fenilo; o son SiR^3 , $-O-SiR^3$, R^3Si -alcoxi (C_1 - C_8), $-CO-O-NR^2$, $-O-N=CR^2$, $-N=CR^2$, $-CH(OR^1)_2$, $-O-(CH_2)_m$, $-CH(OR^1)_2$, $-CR^m(OR^1)_2$, $-O-(CH_2)_mCR^m(OR^1)_2$ o con $R''O-CHR''-CHCOR''$ -alcoxi (C_1 - C_6),

- los R^{51} son, iguales o diferentes, halógeno, nitro, alcoxi (C₁-C₄) y fenilo sin sustituir o sustituido con uno o varios, de modo preferido hasta tres, radicales R^{52} ;
- los R^{52} son, iguales o diferentes, halógeno, alquilo (C₁-C₄), alcoxi (C₁-C₄), haloalquilo (C₁-C₄), haloalcoxi (C₁-C₄) o nitro;
- 5 los R' son, iguales o diferentes, hidrógeno, alquilo (C₁-C₄), fenilo sin sustituir o sustituido con uno o varios, de modo preferido hasta tres, radicales R^{52} , o dos radicales R' forman en común una cadena de alcano (C₂-C₆)-diílo;
- los R'' son, iguales o diferentes, alquilo (C₁-C₄), o dos radicales R'' forman en común una cadena de alcano (C₂-C₆)-diílo;
- 10 R''' es hidrógeno o alquilo (C₁-C₄);
- m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Se prefieren especialmente compuestos de las fórmulas (I) y/o (II), conocidos como antídotos, en los que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

- 15 R^{24} es hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) o cicloalquilo (C₃-C₇), realizándose que los precedentes radicales que contienen C están sin sustituir o sustituidos una vez o múltiples veces con halógeno, o bien una vez o dos veces, de modo preferido una vez, con radicales R^{50} ;
- los R^{50} son, iguales o diferentes, hidroxil, alcoxi (C₁-C₄), carboxil, alcoxi (C₁-C₄)-carbonilo, alquenil (C₂-C₆)-oxicarbonilo, alquinil (C₂-C₆)-oxicarbonilo, 1-(hidroxiimino)-alquilo (C₁-C₄),
- 20 1-[alquil (C₁-C₄)-imino]-alquilo (C₁-C₄) y 1-[alcoxi (C₁-C₄)-imino]-alquilo (C₁-C₄);
- $-\text{SiR}'_3$, $-\text{O}-\text{N}=\text{CR}'_2$, $-\text{N}=\text{CR}'_2$, $-\text{NR}'_2$ y $-\text{O}-\text{NR}'_2$, en los que los R' , iguales o diferentes, significan hidrógeno, alquilo (C₁-C₄), o significan por pares una cadena de alcano (C₄-C₅)-diílo;
- los R^{27} , R^{28} , R^{29} son, iguales o diferentes, hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), haloalquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₇) o fenilo, que está sin sustituir o sustituido con uno o varios radicales seleccionados entre el conjunto formado por
- 25 halógeno, ciano, nitro, amino, mono- y di-[alquil (C₁-C₄)]-amino, alquilo (C₁-C₄), haloalquilo (C₁-C₄), alcoxi (C₁-C₄), haloalcoxi (C₁-C₄), alquil (C₁-C₄)-tio y alquil (C₁-C₄)-sulfonilo;
- R^x es hidrógeno o COOR^{26} , en que R^{26} significa hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), haloalquilo (C₁-C₈), (alcoxi C₁-C₄)-alquilo (C₁-C₄), hidroxil-alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₇) o tri-(alquil (C₁-C₄))-sililo,
- los R^{17} , R^{19} son, iguales o diferentes, hidrógeno, halógeno, metilo, etilo, metoxil, etoxil, haloalquilo (C₁ ó C₂),
- 30 de modo preferido hidrógeno, halógeno o haloalquilo (C₁ ó C₂).

Se prefieren muy especialmente compuestos conocidos como antídotos en los que los símbolos e índices en la fórmula (I) tienen los siguientes significados:

- R^{17} es hidrógeno, halógeno, nitro o haloalquilo (C₁-C₄);
- 35 n' es 0, 1, 2 ó 3;
- R^{18} es un radical de la fórmula OR^{24} ;
- R^{24} es hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) o cicloalquilo (C₃-C₇), realizándose que los precedentes radicales que contienen C están sin sustituir o sustituidos una vez o múltiples veces, de modo preferido hasta tres veces, con radicales que contienen halógeno, iguales o diferentes, o hasta dos veces, de modo preferido una vez,
- 40 con radicales iguales o diferentes, seleccionados entre el conjunto formado por hidroxil, alcoxi (C₁-C₄), alcoxi (C₁-C₄)-carbonilo, alquenil (C₂-C₆)-oxicarbonilo, alquinil (C₂-C₆)-oxicarbonilo, 1-(hidroxiimino)-alquilo (C₁-C₄), 1-[alquil (C₁-C₄)-imino]-alquilo (C₁-C₄), 1-[alcoxi (C₁-C₄)-imino]-alquilo (C₁-C₄) y radicales de las fórmulas $-\text{SiR}'_3$, $-\text{O}-\text{N}=\text{R}'_2$, $-\text{N}=\text{CR}'_2$, $-\text{NR}'_2$ y $-\text{O}-\text{NR}'_2$, realizándose que los radicales R' en las formulas mencionadas, iguales o diferentes, significan hidrógeno, alquilo (C₁-C₄), o por pares
- 45 alcano (C₄ ó C₅)-diílo;
- los R^{27} , R^{28} , R^{29} son, iguales o diferentes, hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), haloalquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₇) o fenilo, que está sin sustituir o sustituido con uno o varios de los radicales seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, alquilo (C₁-C₄), alcoxi (C₁-C₄), nitro, haloalquilo (C₁-C₄) y haloalcoxi (C₁-C₄), y
- 50 R^x es hidrógeno o COOR^{26} , en que R^{26} significa hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), haloalquilo (C₁-C₈), alcoxi (C₁-C₄)-alquilo (C₁-C₄), hidroxil-alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₇) o tri-alquil (C₁-C₄)-sililo.

Se prefieren muy especialmente también compuestos conocidos como antídotos de la fórmula (II), en los que los símbolos e índices tienen los siguientes significados::

- 55 R^{19} es halógeno o haloalquilo (C₁-C₄);
- n' es 0, 1, 2 ó 3, realizándose que $(R^{19})_{n'}$ es de modo preferido 5-Cl;
- R^{20} es un radical de la fórmula OR^{24} ;
- T es CH_2 o $\text{CH}(\text{COO}(\text{alquilo C}_1\text{-C}_3))$ y
- R^{24} es hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), haloalquilo (C₁-C₈) o
- 60 alcoxi (C₁-C₄)-alquilo (C₁-C₄), de modo preferido hidrógeno o alquilo (C₁-C₈).

Se prefieren en particular en este caso compuestos conocidos como antídotos de la fórmula (I), en los que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

- W es (W1);
- 65 R^{17} es halógeno o haloalquilo (C₁-C₂);
- n' es 0, 1, 2 ó 3, realizándose que $(R^{17})_{n'}$ es de modo preferido 2,4-Cl₂;

R^{18} es un radical de la fórmula OR^{24} ;
 R^{24} es hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), haloalquilo (C_1-C_4), hidroxialquilo (C_1-C_4), cicloalquilo (C_3-C_7),
 (alcoxi (C_1-C_4)-alquilo (C_1-C_4) o tri-(alquil (C_1-C_2))-sililo; de modo preferido alquilo (C_1-C_4);
 R^{27} es hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), haloalquilo (C_1-C_4) o cicloalquilo (C_3-C_7), de modo preferido hidrógeno o
 alquilo (C_1-C_4), y
 R^x es $COOR^{26}$, en que R^{26} es hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), haloalquilo (C_1-C_4), hidroxialquilo (C_1-C_4),
 cicloalquilo (C_3-C_7), (alcoxi (C_1-C_4)-alquilo (C_1-C_4) o tri-(alquil (C_1-C_2))-sililo, de modo preferido hidrógeno o
 alquilo (C_1-C_4);

Se prefieren en particular en este caso también compuestos conocidos como antídotos de la fórmula (I), en los que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

W es ($W2$);
 R^{17} es halógeno o haloalquilo (C_1-C_2);
 n' es 0, 1, 2 ó 3, realizándose que $(R^{17})_{n'}$ es de modo preferido 2,4- Cl_2 ;
 R^{18} es un radical de la fórmula OR^{24} ;
 R^{24} es hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), haloalquilo (C_1-C_4), hidroxialquilo (C_1-C_4), cicloalquilo (C_3-C_7),
 alcoxi (C_1-C_4)-alquilo (C_1-C_4) o tri-(alquil (C_1-C_2))-sililo, de modo preferido alquilo (C_1-C_4), y
 R^{27} es hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), haloalquilo (C_1-C_4), cicloalquilo (C_3-C_7) o fenilo sustituido o sin sustituir, de
 modo preferido hidrógeno, alquilo (C_1-C_4) o fenilo, que está sin sustituir o sustituido con uno o varios
 radicales seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, alquilo (C_1-C_4), haloalquilo (C_1-C_4), nitro,
 ciano o alcoxi (C_1-C_4).

Se prefieren en particular en este caso también compuestos conocidos como antídotos de la fórmula (I), en los que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

W es ($W3$);
 R^{17} es halógeno o haloalquilo (C_1-C_2);
 n' es 0, 1, 2 ó 3, realizándose que $(R^{17})_{n'}$ es de modo preferido 2,4- Cl_2 ;
 R^{18} es un radical de la fórmula OR^{24} ;
 R^{24} es hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), haloalquilo (C_1-C_4), hidroxialquilo (C_1-C_4), cicloalquilo (C_3-C_7),
 alcoxi (C_1-C_4)-alquilo (C_1-C_4) o tri-(alquil (C_1-C_2))-sililo, de modo preferido alquilo (C_1-C_4), y
 R^{28} es alquilo (C_1-C_8) o haloalquilo (C_1-C_4), de modo preferido haloalquilo C_1 .

Se prefieren en particular en este caso también compuestos conocidos como antídotos de la fórmula (I), en los que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

W es ($W4$);
 R^{17} es halógeno, nitro, alquilo (C_1-C_4), haloalquilo (C_1-C_2), de modo preferido CF_3 , o alcoxi (C_1-C_4);
 n' es 0, 1, 2 ó 3,
 m' es 0 ó 1;
 R^{18} es un radical de la fórmula OR^{24} ;
 R^{24} es hidrógeno, alquilo (C_1-C_4), carboxi-alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4)-carbonil-alquilo (C_1-C_4), de modo
 preferido alcoxi (C_1-C_4)- $CO-CH_2-$, alcoxi (C_1-C_4)- $CO-C(CH_3)H-$, $HO-CO-CH_2-$ ó $HO-CO-C(CH_3)H-$, y
 R^{29} es hidrógeno, alquilo (C_1-C_4), haloalquilo (C_1-C_4), cicloalquilo (C_3-C_7) o fenilo, que está sin sustituir o
 sustituido con uno o varios de los radicales seleccionados entre el conjunto formado por halógeno,
 alquilo (C_1-C_4), haloalquilo (C_1-C_4), nitro, ciano y alcoxi (C_1-C_4).

Los siguientes conjuntos de compuestos conocidos como antídotos son apropiados en particular como sustancias activas para el aumento de la tolerancia de las plantas frente a agentes estresores abióticos:

- Compuestos del tipo del ácido diclorofenilpirazolina-3-carboxílico (es decir de la fórmula (I), en la que W es = ($W1$) y $(R^{17})_{n'}$ es = 2,4- Cl_2), de modo preferido compuestos tales como el éster etílico de ácido 1-(2,4-diclorofenil)-5-(etoxicarbonil)-5-metil-2-pirazolina-3-carboxílico (I-1, mefenpir-dietilo), mefenpir-dimetilo y mefenpir (I-0), y compuestos afines, tal como se describen en el documento WO-A 91/07874;
- Derivados del ácido diclorofenilpirazolcarboxílico (es decir de la fórmula (I), en la que W es = ($W2$) y $(R^{17})_{n'}$ es = 2,4- Cl_2), de modo preferido compuestos tales como el éster etílico de ácido 1-(2,4-diclorofenil)-5-metil-pirazol-3-carboxílico (I-2), el éster etílico de ácido 1-(2,4-diclorofenil)-5-isopropil-pirazol-3-carboxílico (I-3), el éster etílico de ácido 1-(2,4-diclorofenil)-5-(1,1-dimetil-etil)pirazol-3-carboxílico (I-4), el éster etílico de ácido 1-(2,4-dicloro-fenil)-5-fenil-pirazol-3-carboxílico (I-5) y compuestos afines, tal como se describen en los documentos EP-A-0 333 131 y EP-A-0 269 806.
- Compuestos del tipo de los ácidos triazolcarboxílicos (es decir de la fórmula (I), en los que W es = ($W3$) y $(R^{17})_{n'}$ es = 2,4- Cl_2), de modo preferido compuestos tales como fenclorazol-etilo, es decir el éster etílico de ácido 1-(2,4-diclorofenil)-5-triclorometil-(1H)-1,2,4-triazol-3-carboxílico (I-6), y compuestos afines (véanse los documentos EP-A-0 174 562 y EP-A-0 346 620);

- d) Compuestos del tipo del ácido 5-bencil- o 5-fenil-2-isoxazolina-3-carboxílico o del ácido 5,5-difenil-2-isoxazolina-3-carboxílico tales como isoxadifeno (I-12), (en los que W es = (W4)), de modo preferido compuestos tales como el éster etílico de ácido 5-(2,4-dicloro-bencil)-2-isoxazolina-3-carboxílico (I-7) o el éster etílico de ácido 5-fenil-2-isoxazolina-3-carboxílico (I-8) y compuestos afines, tal como se describen en el documento WO-A-91/08202, o de los ésteres etílico (I-9, isoxadifeno-etilo) o n-propílico (I-10) del ácido 5,5-difenil-2-isoxazolina-carboxílico, o del éster etílico de ácido 5-(4-fluoro-fenil)-5-fenil-2-isoxazolina-3-carboxílico (I-11), tal como se describen en el documento WO-A-95/07897.
- e) Compuestos del tipo del ácido 8-quinolinoxi-acético, p.ej. los de la fórmula (II), en la que $(R^{19})_n$ es = 5-Cl, R^{20} es = OR^{24} y T es = CH_2 , de modo preferido los compuestos éster (1-metil-hexílico) de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)acético (II-1, cloquintocet-mexilo), éster (1,3-dimetil-but-1-ílico) de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)acético (II-2), éster 4-aliloxi-butílico de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)acético (II-3), éster 1-aliloxi-prop-2-ílico de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)acético (II-4), éster etílico de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)acético (II-5), éster metílico de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)acético (II-6), éster alílico de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)acético (II-7), éster 2-(2-propiliden-iminooxi)-1-etílico de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)acético (II-8), éster 2-oxo-prop-1-ílico de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)acético (II-9) ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)acético (II-10) y sus sales, tal como se describen p.ej. en el documento WO-A-2002/34048, y compuestos afines, tal como se describen en los documentos EP-A-0 860 750, EP-A-0 094 349 y EP-A-0 191 736 ó EP-A-0 492 366.
- f) Compuestos del tipo del ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)-malónico, es decir los de la fórmula (II), en la que $(R^{19})_n$ es = 5-Cl, R^{20} es = OR^{24} y T es = $-CH(COO\text{-alquilo})$, de modo preferido los compuestos éster dietílico de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)-malónico (II-11), éster dialílico de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)malónico, éster metílico y etílico de ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)malónico y compuestos afines, tal como se describen en el documento EP-A-0 582 198.
- g) Compuestos del tipo de las dicloroacetamidas, es decir de la fórmula (III), de modo preferido N,N-dialil-2,2-dicloroacetamida (dicloromida (III-1), del documento US-A-4 137 070), 4-dicloroacetil-3,4-dihidro-3-metil-2H-1,4-benzoxazina (IV-2, benoxacor, del documento EP 0 149 974), N1,N2-dialil-N2-dicloroacetilglicinamida (DKA-24 (III-3), del documento de patente húngara HU 2143821), 4-dicloroacetil-1-oxa-4-aza-espiro[4,5]decano (AD-67), 2,2-dicloro-N-(1,3-dioxolan-2-ilmetil)-N-(2-propenil)acetamida (PPG-1292), 3-dicloroacetil-2,2,5-trimetiloxazolidina (R-29148, III-4), 3-dicloroacetil-2,2-dimetil-5-feniloxazolidina, 3-dicloroacetil-2,2-dimetil-5-(2-tienil)oxazolidina, 3-dicloroacetil-5-(2-furanil)-2,2-dimetiloxazolidina (furilazol (III-5), MON 13900), 1-dicloroacetil-hexahidro-3,3,8a-trimetil-pirrol [1,2-a]pirimidin-6-(2H)-ona (diciclonona, BAS 145138),
- h) Compuestos del conjunto (b), de modo preferido anhídrido de ácido 1,8-naftálico (b-1), difenilmetoxiacetato de metilo (b-2), cianometoxiimino(fenil)acetonitrilo (ciometrinilo) (b-3), 1-(2-clorobencil)-3-(1-metil-1-feniletil)urea (cumilurón) (b-4), fosforoditioato de O,O-dietilo S-2-etiltioetilo (disulfotón) (b-5), metilcarbamato de 4-clorofenilo (mefenato) (b-6), fosforotioato de O,O-dietil-O-fenilo (dietolato) (b-7), ácido 4-carboxi-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-4-acético (CL-304415, CAS-Nº de reg: 31541-57-8) (b-8), 1,3-dioxolan-2-ilmetoxiimino(fenil)acetonitrilo (oxabetrinilo) (b-9), O-1,3-dioxolan-2-ilmetil-oxima de 4'-cloro-2,2,2-trifluoroacetofenona (fluxofenim) (b-10), 4,6-dicloro-2-fenilpirimidina (fenclorim) (b-11), 2-cloro-4-trifluorometil-1,3-tiazol-5-carboxilato de bencilo (flurazol) (b-12), 2-diclorometil-2-metil-1,3-dioxolano (MG-191) (b-13), N-(4-metilfenil)-N'-(1-metil-1-feniletil)urea (dimrón) (b-14), ácido (2,4-diclorofenoxi)acético (2,4-D), ácido (4-clorofenoxi)acético, ácido (R,S)-2-(4-cloro-o-toliloxi)propiónico (mecoprop), ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butírico (2,4-DB), ácido (4-cloro-o-toliloxi)acético (MCPA), ácido 4-(4-cloro-o-toliloxi)butírico, ácido 4-(4-clorofenoxi)butírico, ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba), 3,6-dicloro-2-metoxibenzoato de 1-(etoxicarbonil)etilo (lactidicloro)

así como sus sales y ésteres, de modo preferido (C₁-C₈).

Son preferidos además unos compuestos de la fórmula (IV) conocidos como antidotos, o sus sales, en los que

5 R^{30} significa hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₆), furanilo o tienilo, realizándose que cada uno de los 4 radicales mencionados en último término está sin sustituir o sustituido con uno o varios sustituyentes seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, alcoxi (C₁-C₄), halógeno-alcoxi (C₁-C₆) y alquil (C₁-C₄)-tio y, en el caso de radicales cíclicos, también con alquilo (C₁-C₄) y haloalquilo (C₁-C₄);

R^{31} significa hidrógeno;

10 R^{32} significa halógeno, halógeno-alquilo (C₁-C₄), halógeno-alcoxi (C₁-C₄), alquilo (C₁-C₄), alcoxi (C₁-C₄), alquil (C₁-C₄)-sulfonilo, alcoxi (C₁-C₄)-carbonilo o alquil (C₁-C₄)-carbonilo, de modo preferido halógeno, halógeno-alquilo (C₁-C₄), tal como trifluorometilo, alcoxi (C₁-C₄), halógeno-alcoxi (C₁-C₄), alcoxi (C₁-C₄)-carbonilo o alquil (C₁-C₄)-sulfonilo;

R^{33} significa hidrógeno;

15 R^{34} significa halógeno, alquilo (C₁-C₄), halógeno-alquilo (C₁-C₄), halógeno-alcoxi (C₁-C₄), cicloalquilo (C₃-C₆), fenilo, alcoxi (C₁-C₄), ciano, alquil (C₁-C₄)-tio, alquil (C₁-C₄)-sulfonilo, alquil (C₁-C₄)-sulfonilo, alcoxi (C₁-C₄)-carbonilo o alquil (C₁-C₄)-carbonilo, de modo preferido halógeno, alquilo (C₁-C₄), halógeno-alquilo (C₁-C₄), tal como trifluorometilo, halógeno-alcoxi (C₁-C₄), alcoxi (C₁-C₄) o alquil (C₁-C₄)-tio,

n significa 0, 1 ó 2 y

20 m significa 1 ó 2.

Son especialmente preferidos unos compuestos de la fórmula (IV) conocidos como antidotos, en los que

R^{30} = es H₃C-O-CH₂-, R^{31} = R^{33} = H, R^{34} = 2-OMe (IV-1),
 R^{30} = es H₃C-O-CH₂-, R^{31} = R^{33} = H, R^{34} = 2-OMe-5-Cl (IV-2),
 25 R^{30} = es ciclopropilo, R^{31} = R^{33} = H, R^{34} = 2-OMe (IV-3),
 R^{30} = es ciclopropilo, R^{31} = R^{33} = H, R^{34} = 2-OMe-5-Cl (IV-4),
 R^{30} = es ciclopropilo, R^{31} = R^{33} = H, R^{34} = 2-Me (IV-5),
 R^{30} = es terc.-butilo, R^{31} = R^{33} = H, R^{34} = 2-OMe (IV-6).

Además, son preferidos unos compuestos de la fórmula (V) conocidos como antidotos, en los que

X^3 significa CH;

35 R^{35} significa hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₆), alqueno (C₂-C₆), cicloalqueno (C₅-C₆), fenilo o heterocíclico de 3 a 6 miembros con hasta tres heteroátomos seleccionados entre el conjunto formado por nitrógeno, oxígeno y azufre, realizándose que los seis radicales mencionados en último término están sustituidos eventualmente con uno o varios sustituyentes, iguales o diferentes, seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, alcoxi (C₁-C₆), haloalcoxi (C₁-C₆), alquil (C₁-C₂)-sulfonilo, alquil (C₁-C₂)-sulfonilo, cicloalquilo (C₃-C₆), alcoxi (C₁-C₄)-carbonilo, alquil (C₁-C₄)-carbonilo y fenilo y, en el caso de radicales cíclicos, también con alquilo (C₁-C₄) y haloalquilo (C₁-C₄);

40 R^{36} significa hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alqueno (C₂-C₆), alquino (C₂-C₆), realizándose que los tres radicales mencionados en último término están sustituidos eventualmente con uno o varios sustituyentes, iguales o diferentes, seleccionados entre el conjunto formado por halógeno, hidroxi, alquilo (C₁-C₄), alcoxi (C₁-C₄) y alquil (C₁-C₄)-tio;

R^{37} significa halógeno, haloalquilo (C₁-C₄), haloalcoxi (C₁-C₄), nitro, alquilo (C₁-C₄), alcoxi (C₁-C₄), alquil (C₁-C₄)-sulfonilo, alcoxi (C₁-C₄)-carbonilo o alquil (C₁-C₄)-carbonilo;

45 R^{38} significa hidrógeno;

R^{39} significa halógeno, nitro, alquilo (C₁-C₄), haloalquilo (C₁-C₄), haloalcoxi (C₁-C₄), cicloalquilo (C₃-C₆), fenilo, alcoxi (C₁-C₄), ciano, alquil (C₁-C₄)-tio, alquil (C₁-C₄)-sulfonilo, alquil (C₁-C₄)-sulfonilo, alcoxi (C₁-C₄)-carbonilo o alquil (C₁-C₄)-carbonilo;

n significa 0, 1 ó 2 y

50 m significa 1 ó 2.

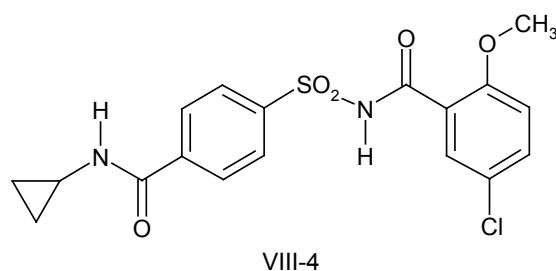
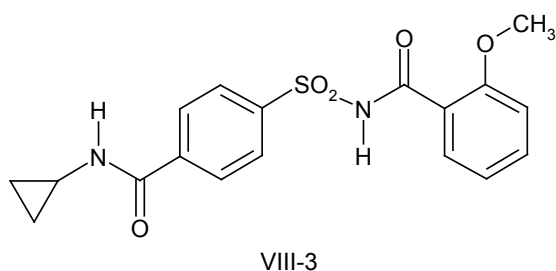
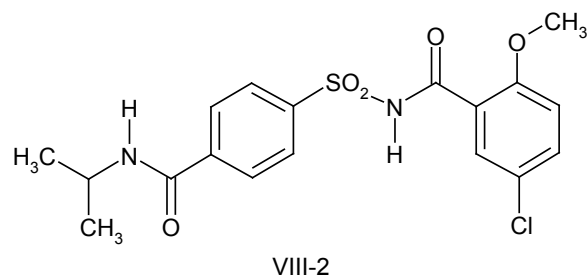
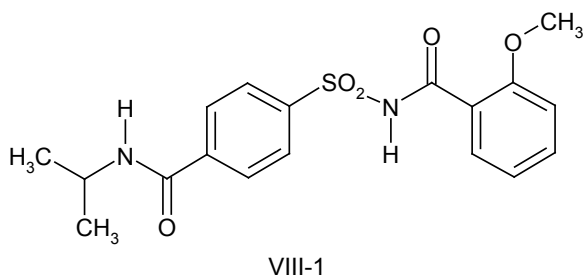
Unos preferidos compuestos de la fórmula (VI) conocidos como antidotos, son (S3-1), (S3-2), (S3-3), (S3-4) y (S3-5).

Son preferidos también unos compuestos de la fórmula (VII)

55 1-[4-(N-2-metoxibenzoilsulfamoil)fenil]-3-metilurea (VII-1),
 1-[4-(N-2-metoxibenzoilsulfamoil)fenil]-3,3-dimetilurea (VII-2),
 1-[4-(N-4,5-dimetilbenzoilsulfamoil)fenil]-3-metilurea (VII-3) y
 1-[4-(N-naftoilsulfamoil)fenil]-3,3-dimetilurea (VII-4).

60

Son asimismo preferidos unos compuestos de las fórmulas VIII-1 hasta VIII-4



de los cuales a su vez el compuesto VIII-3 (4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)bencenosulfonamida) es muy especialmente preferido para su utilización como agente para el aumento de la tolerancia de las plantas frente a agentes estresores abióticos.

Unos compuestos especialmente preferidos para su utilización como agentes para el aumento de la tolerancia de las plantas frente a agentes estresores abióticos, son los que se seleccionan entre el conjunto de compuestos conocidos como antidotos que se compone de los compuestos de las fórmulas I-1 (mefenpir-dietilo), I-9 (isoxadifen-etilo), II-1 (cloquintocet-mexilo), b-11 (fenclorim), b-14 (dimrón), y VIII-3 (4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)bencenosulfonamida); (son muy especialmente preferidos los compuestos I-1 y VIII-3).

Los compuestos previamente identificados/mencionados, en ciertas circunstancias ya conocidos como antidotos, se pueden emplear también en plantas modificadas por tecnología genética.

Las plantas modificadas por tecnología genética (también denominadas transgénicas) se distinguen por regla general por especiales propiedades ventajosas, por ejemplo por resistencias frente a determinados plaguicidas, sobre todo frente a determinados herbicidas, por resistencias frente a enfermedades de plantas o agentes patógenos de enfermedades de plantas, tales como determinados insectos o microorganismos tales como hongos, bacterias o virus. Otras propiedades especiales conciernen p.ej. al material cosechado en lo referente a la cantidad, la calidad, la aptitud para el almacenamiento, la composición y las sustancias constitutivas especiales. Así, se conocen plantas transgénicas con un contenido aumentado de almidón o con una calidad modificada del almidón, o las que tienen una distinta composición de ácidos grasos del material cosechado.

Se prefiere la utilización de los compuestos identificados/mencionados conocidos como antidotos o sus sales en cultivos transgénicos económicamente importantes de plantas útiles y ornamentales, p.ej. las de cereales tales como tales como trigo, cebada, centeno, avena, mijo, arroz y maíz, o también cultivos de remolacha azucarera, algodón, soja, colza, patata, tomate, guisantes y otras especies de hortalizas y legumbres, de manera especialmente preferida en cultivos de maíz, trigo, cebada, centeno, avena, arroz, colza, remolacha azucarera y soja, de manera especialmente preferida en cultivos de maíz, trigo, arroz, colza, remolacha azucarera y soja.

Junto a esto, también se pueden tratar plantas transgénicas con sustancias que han sido identificadas con ayuda de microconjuntos de ADN así como también con las moléculas ya conocidas como antidotos, cuya tolerancia frente a los agentes estresores abióticos ya ha sido aumentada por medidas de tecnología genética, de modo que se observa un efecto sinérgico de la tolerancia codificada endógenamente y del efecto aumentador de la tolerancia aplicado externamente.

Vías habituales para la producción de nuevas plantas, que en comparación con las plantas hasta ahora existentes presentan propiedades modificadas, consisten por ejemplo en procedimientos clásicos de cultivación y procreación y en la producción de mutantes. Alternativamente, se pueden producir nuevas plantas con propiedades modificadas con ayuda de procedimientos de tecnología genética (véanse p.ej. los documentos EP-A-0221044 y EP-A-0131624). Se describieron, por ejemplo, en varios casos

- modificaciones por tecnología genética de plantas cultivadas, con la finalidad de conseguir una modificación del almidón sintetizado en las plantas (véanse p.ej., los documentos WO 92/11376, WO 92/14827 y WO 91/19806),
- 5 - plantas cultivadas transgénicas, que presentan resistencias contra determinados herbicidas del tipo de glufosinato (compárense p.ej. los documentos EP-A-0242236, EP-A-242246) o de glifosato (documento WO 92/00377), o de las sulfonil-ureas (documentos EP-A-0257993 y US-A-5013659),
- plantas cultivadas transgénicas, por ejemplo de algodón, con la capacidad de producir toxinas de *Bacillus thuringiensis* (toxinas de Bt), que hacen que las plantas se vuelvan resistentes contra determinadas plagas (documentos EP-A-0142924, EP-A-0193259),
- 10 - plantas cultivadas transgénicas con una composición modificada de ácidos grasos (documento WO 91/13972).

Numerosas técnicas de biología molecular, con las que se pueden producir nuevas plantas transgénicas con propiedades alteradas, son conocidas en principio; véanse p.ej. las citas de Sambrook y colaboradores, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Clonación molecular, un manual de laboratorio), 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; o de Winnacker "Gene und Klone" [Genes y clones], VCH Weinheim, 2ª edición, 1996, o de Christou, "Trends in Plant Science" [Tendencias en la ciencia de las plantas] 1 (1996) 423-431).

20 Para tales manipulaciones por tecnología genética, se pueden incorporar en plásmidos unas moléculas de ácidos nucleicos, que permiten una mutagénesis o una modificación de las secuencias por medio de una recombinación de secuencias de ADN. Con ayuda de los procedimientos clásicos antes mencionados, se pueden llevar a cabo p.ej. intercambios de bases, eliminar secuencias parciales o añadir secuencias naturales o sintéticas. Para la unión de los fragmentos de ADN unos con otros, se pueden adosar adaptadores o engarzadores a los fragmentos.

25 La producción de células de plantas con una actividad disminuida de un producto génico se puede conseguir por ejemplo mediante la expresión de por lo menos un correspondiente ARN antisentido, de un ARN del mismo sentido para conseguir un efecto de supresión conjunta, o la expresión de por lo menos una ribozima correspondientemente construida, que disocia específicamente a transcritos del producto génico antes mencionado.

30 Para esto se pueden utilizar, por una parte, moléculas de ADN, que abarcan la secuencia codificadora total de un producto génico, inclusive secuencias flanqueadoras eventualmente presentes, así como también moléculas de ADN, que abarcan solamente partes de la secuencia codificadora, teniendo estas partes que ser lo suficientemente largas como para producir en las células un efecto antisentido. Es posible también la utilización de secuencias de ADN, que presentan un alto grado de homología con respecto a las secuencias codificadoras de un producto génico, pero no son totalmente idénticas.

35 En el caso de la expresión de moléculas de ácidos nucleicos en plantas, la proteína sintetizada puede estar localizada en cualquier compartimiento arbitrario de la célula vegetal. Sin embargo, con el fin de conseguir la localización en un compartimiento determinado, p.ej. la región codificadora se puede reunir con secuencias de ADN, que garantizan la localización en un determinado compartimiento. Tales secuencias son conocidas para un experto en la especialidad (véanse por ejemplo las citas de Braun y colaboradores, EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; de Wolter y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; y de Sonnewald y colaboradores, Plant J. 1 (1991) 95-106).

45 Las células de plantas transgénicas se pueden regenerar de acuerdo con técnicas conocidas para dar plantas enteras. En el caso de las plantas transgénicas, se puede tratar en principio de plantas de cualquier especie vegetal arbitraria, es decir, plantas tanto monocotiledóneas como también dicotiledóneas.

50 Así, se pueden obtener plantas transgénicas, que presentan propiedades modificadas, mediante sobreexpresión, supresión o inhibición de genes o secuencias de genes homólogos/as (= naturales) o expresión de genes o secuencias de genes heterólogos/as (= ajenos/as).

55 Preferiblemente, las moléculas identificadas con ayuda de los microconjuntos de ADN, o sino conocidas como antídotos, se pueden emplear en cultivos transgénicos, que son resistentes contra herbicidas tomados del conjunto de las sulfonil-ureas, del glufosinato-amonio o del glifosato-isopropilamonio y de sustancias activas análogas, y/o que sobre la base de una modificación realizada con la ayuda de la tecnología genética presentan una tolerancia endógena frente a agentes estresores abióticos.

60 En el caso de la utilización de las sustancias activas conformes al invento en cultivos transgénicos, junto a los efectos que se pueden observar en otros cultivos frente a plantas dañinas, aparecen con frecuencia unos efectos que son específicos para la aplicación en el respectivo cultivo transgénico, por ejemplo un espectro modificado o ampliado especialmente de malezas, que se pueden reprimir, cantidades consumidas modificadas, que se pueden emplear para la aplicación, preferiblemente una buena capacidad de combinación con los herbicidas, frente a los que es resistente el cultivo transgénico, así como una influencia sobre la vegetación y el rendimiento de las plantas cultivadas transgénicas.

Se muestra la utilización de los compuestos identificados con microconjuntos de ADN, o respectivamente de compuestos ya conocidos como antidotos, con el fin de aumentar la tolerancia frente a agentes estresores abióticos en plantas cultivadas transgénicas, de manera preferida con la finalidad de aumentar el rendimiento de las cosechas.

Se muestra un procedimiento para el descubrimiento de un compuesto que aumente la tolerancia frente a agentes estresores abióticos en las plantas, siendo valorado como indicio de la inducción el aumento de la transcripción o respectivamente de la expresión de genes individuales o múltiples, que son endógenos para las plantas, tales como por ejemplo genes que codifican proteínas del conjunto de las citocromo - oxidasa, tales como la citocromo - oxidasa P 450, las glicosil - transferasas, uricasas, tales como la uricase II (E.C.17.3.3), las peptidasas, diferentes proteínas membranales, las amido - hidrolasas, así como diferentes proteínas de estrés generales.

En el presente contexto está contenido un procedimiento para el descubrimiento de compuestos, que inducen la transcripción de los genes que codifican enzimas de la tolerancia a un estrés, que son endógenas para las plantas, caracterizado porque:

- a) unas plantas de ensayo se someten a la acción de uno o varios agentes estresores abióticos,
- b) unas plantas testigos, en condiciones por lo demás iguales a las de las plantas de ensayo comprendidas dentro de a), se ponen en contacto adicionalmente con un compuesto que se ha de ensayar, ya sea en forma de un material de simiente desinfectado, o la atomización en un momento determinado del desarrollo o por absorción a través de las raíces,
- c) se extrae un ARN a partir de las plantas de ensayo y testigos,
- d) el ARN es marcado directamente ya sea de modo radiactivo o no radiactivo, o sino el ARN, mediando transcripción enzimática simultánea en el correspondiente ADNc, es marcado de modo radiactivo o no radiactivo, o sino el ADNc no marcado, que se ha obtenido, es transcrito enzimáticamente en un correspondiente ARNc marcado de modo radiactivo o no radiactivo,
- e) un microconjunto de ADN, que contiene secuencias de ADN vegetales, se hibrida con las sustancias obtenidas según la etapa d),
- f) se establecen unos perfiles de expresión de los genes para la expresión de diferentes proteínas de estrés, de un modo comparativo para las plantas ensayadas según a) y b),
- g) se efectúa una cuantificación de las diferencias de expresión medidas según f), y
- h) se efectúa una sistematización final de los productos de expresión asociados según g), mediante un análisis de racimos.

En el caso de la etapa d) anteriormente mencionada, la transcripción enzimática del ADNc obtenido en un ARNc ha de considerarse como etapa preferida del procedimiento, puesto que mediante ella se puede conseguir una nueva amplificación de la muestra de hibridación. Asimismo se prefiere la marcación mediante nucleótidos no radiactivos, de manera especialmente preferida la marcación mediante un UTP y/o CTP biotinilado, efectuándose la detección, a continuación de la reacción de hibridación efectuada, mediante una fijación de estreptavidina-ficoeritrina como fluoróforo y el ARNc biotinilado. Una detección de la fluorescencia específica de la ficoeritrina, que sirve como fundamento para la cuantificación de las diferencias medidas de expresión, se efectúa a continuación de la hibridación con ayuda de un explorador por láser.

Un objeto preferido es un procedimiento con mantenimiento de las etapas de procedimiento a) - h) antes mencionadas, comparándose, en el caso del aumento pretendido en el caso de un estrés por calor, los genes para la expresión de las citocromo - oxidasa, tales como la citocromo - oxidasa P450, las glicosil - transferasas, las uricasas tales como la uricase II (E.C.17.3.3), las peptidasas, diferentes proteínas membranales, las amido - hidrolasas en el caso de las plantas estresadas por calor y no estresadas por calor, de manera preferida los genes que se usan para la expresión de la "amido - hidrolasa de N-carbamil-L-aminoácidos" (Zm.11840.1.A1_at), de la "serina - carboxipeptidasa" (Zm.18994.2.A1_a_at), de la uricase II (E.C.1.7.3.3) y de la glicosil - transferasa (Zm.12587.1.S1_s_at), de manera muy especialmente preferida los genes que se usan para la expresión de la "amido - hidrolasa de N-carbamil-L-aminoácidos" (Zm.11840.1.A1_at) y de la "serina - carboxipeptidasa" (Zm.18994.2.A1_a_at) (signatura según el conjunto del genoma de maíz de la entidad Affymetrix (Affymetrix Inc., 3380 Central Expressway, Santa Clara, CA, EE.UU.))

y siendo aumentada la expresión de los genes frente a la de una planta testigo estresada por sequedad en el caso del tratamiento con, por ejemplo por el factor de 1,5 o más, preferiblemente por el factor de 1,5 a 30, de manera preferida de 1,5 a 20, de manera especialmente preferida por el de 1,5 a 10, de manera muy especialmente preferida por el de 1,5 a 5, pudiendo estar situado el aumento de los perfiles de expresión modificados de los genes individuales, independientemente unos de otros, en los intervalos de magnitudes diferentes, que se han mencionado con anterioridad.

Un objeto asimismo preferido es un procedimiento con mantenimiento de las etapas de procedimiento a) - h) antes mencionadas, comparándose en el caso del aumento pretendido en el caso de un estrés por sequedad, por ejemplo los genes para la expresión de las proteínas abundantes en embriogénesis tardía, tales como las deshidrinas, de la proteína de estrés universal (Zm.818.1.A1_at), de la hemoglobina no simbiótica (Zm.485.1.A1_at), de la proteína con la dirección "Zm.818.2.A1_a_at" (conjunto del genoma de maíz de la entidad Affymetrix (Affymetrix Inc., 3380 Central

Expressway, Santa Clara, CA, EE.UU.)) y de la proteína con la dirección "Zm.18682.1.A1_s_at" (conjunto del genoma de maíz de la entidad Affymetrix (Affymetrix Inc., 3380 Central Expressway, Santa Clara, CA, EE.UU.)), en el caso de plantas estresadas por sequedad y no estresadas por sequedad, de manera preferida los genes para la expresión de la proteína de estrés universal (Zm.818.1.A1_at), de la hemoglobina no simbiótica (Zm.485.1.A1_at), de la proteína con la dirección Zm.818.2.A1_a_at (signatura según el conjunto del genoma de maíz de la entidad Affymetrix (Affymetrix Inc., 3380 Central Expressway, Santa Clara, CA, EE.UU.)) y de la proteína con la dirección "Zm.18682.1.A1_s_at" (conjunto del genoma de maíz de la entidad Affymetrix (Affymetrix Inc., 3380 Central Expressway, Santa Clara, CA, EE.UU.))

y siendo aumentada la expresión de los genes frente a la de una planta testigo estresada por sequedad en el caso del tratamiento con, por ejemplo por el factor de 1,5 o más, preferiblemente por el factor de 1,5 a 30, de manera preferida por el de 1,5 a 20, de manera especialmente preferida por el de 1,5 a 10, de manera muy especialmente preferida por el de 1,5 a 8, pudiendo estar situado el aumento de los perfiles de expresión modificados de los genes individuales, independientemente unos de otros, en los intervalos de magnitudes diferentes, que se han mencionado con anterioridad.

Es un objeto, además, la utilización de determinados microconjuntos de ADN, que se usan sobre la base de informaciones genéticas procedentes de plantas, de manera preferida la información genética procedente de plantas útiles, de manera especialmente preferida procedente de plantas útiles, tales como por ejemplo las de maíz, cereales, tales como trigo, cebada, centeno, avena, arroz y soja, de manera preferida a partir de maíz, trigo, cebada, centeno, arroz y soja, de manera especialmente preferida a partir de cebada, maíz, trigo, arroz y soja, de manera muy especialmente preferida a partir de maíz, trigo y soja, para el descubrimiento de modelos modificados de expresión de genes. En tal contexto, las modificaciones relativas de los modelos de genes se consideran para genes de diferentes proteínas de estrés en plantas tratadas con los compuestos que se han de ensayar, en comparación con plantas testigos sin tratar en condiciones de estrés por lo demás idénticas.

Es un objeto, además de esto, la utilización de los promotores de los genes indicadores descritos en unión con genes reporteros especiales (p.ej. GUS, GFP, luciferasa, etc.) para el descubrimiento de sustancias con un efecto positivo sobre la tolerancia al estrés abiótico en plantas cultivadas. En tal caso se producen unas plantas de ensayo transgénicas, que contienen las mencionadas entidades constructivas de genes reporteros y promotores. Las sustancias activas que aumentan la tolerancia al estrés abiótico de plantas de acuerdo con el mecanismo descrito, inducen la expresión del gen reportero y se pueden identificar con ayuda de un ensayo colorimétrico, fluorimétrico o de otro tipo, que sea apropiado para esto.

Es un objeto, por lo demás, la utilización de los genes indicadores descritos para el aumento de la tolerancia al estrés abiótico en plantas cultivadas transgénicas. En este contexto, los genes son fusionados con un promotor apropiado, que posee la fuerza y la especificidad deseadas, y transforma a las entidades constructivas en plantas cultivadas monocotiledóneas o dicotiledóneas. Las plantas transgénicas producidas se distinguen por una tolerancia aumentada frente a un estrés abiótico, p.ej. por frío, calor, sequedad, etc.

Un objeto adicional es también la utilización de unos compuestos que se habían identificado con ayuda del microconjunto de ADN, tomando en consideración los perfiles de expresión de los genes de los compuestos que habían sido identificados y/o ya conocidos como antidotos, que actúan, en el caso de ciertas condiciones de estrés abióticos, tal como por ejemplo frente a agentes estresores abióticos que actúan sobre esta planta, tales como la temperatura (frío, helada o calor), el agua (sequedad o sequía), o la carga química (deficiencia o exceso de sales minerales, de metales pesados, agentes dañinos (= noxos) gaseosos), de una manera positiva, es decir aumentando la expresión en lo referente a su efecto inductivo de los mecanismos de defensa endógenos de las plantas sobre genes individuales o múltiples, tal como, por ejemplo, en el caso de un estrés por calor, actúan sobre citocromo - oxidasa, tales como la citocromo - oxidasa P450, sobre glicosil - transferasas, sobre uricasas, tales como la uricase II (E.C.17.3.3), sobre peptidasas, sobre diferentes proteínas membranales, sobre amido - hidrolasas y/o sobre diferentes proteínas de estrés y/o por ejemplo en el caso de un estrés por sequedad, de una manera positiva, es decir aumentando la expresión en lo referente a su efecto inductivo sobre genes individuales o múltiples de la proteína de estrés universal, de la hemoglobina no simbiótica (Zm.485.1.A1_at), de la proteína con la dirección "Zm.818.2.A1_a_at" (conjunto del genoma de maíz de la entidad Affymetrix (Affymetrix Inc., 3380 Central Expressway, Santa Clara, CA, EE.UU.)) y de la proteína con la dirección "Zm.18682.1.A1_s_at" (signatura según el conjunto del genoma de maíz de la entidad Affymetrix (Affymetrix Inc., 3380 Central Expressway, Santa Clara, CA, EE.UU.)), como sustancias activas para el aumento de la tolerancia al estrés en el caso de plantas útiles.

Es un objeto también la utilización de sustancias identificadas con ayuda del microconjunto de ADN, así como también de las moléculas ya conocidas como antidotos, con el fin de aumentar la tolerancia frente a agentes estresores abióticos en diferentes plantas cultivadas, tales como las de maíz, cereales, tales como trigo, cebada, centeno, avena, arroz y soja, de manera preferida maíz, trigo, cebada, centeno, arroz y soja, de manera especialmente preferida maíz, trigo, arroz y soja, de manera muy especialmente preferida maíz, trigo y soja.

Es un objeto, por lo tanto, también la utilización de unos compuestos que se habían identificado con ayuda del microconjunto de ADN tomando en consideración el perfil de expresión de los genes y/o de unos compuestos ya conocidos como antidotos, que en plantas, directa o indirectamente, tal como por ejemplo mediante una cadena de

transducción de señales, contribuyen al aumento de la tolerancia frente a agentes estresores abióticos, tales como por ejemplo la temperatura (tal como frío, helada o calor), el agua (tal como sequedad, sequía o anoxia) o la carga química (tal como deficiencia o exceso de sales minerales, metales pesados y agentes dañinos gaseosos), para aumentar el rendimiento de las cosechas, para prolongar el período de vegetación, para hacer posible una siembra más temprana, para aumentar la calidad, o para utilizarse en el marco de la procreación o cultivación mediando utilización de linajes consanguíneos por lo demás menos vitales.

Es un objeto, por lo tanto, también un procedimiento para aumentar el rendimiento de las cosechas en cultivos de plantas útiles, para prolongar el período de vegetación, para hacer posible una siembra más temprana, para aumentar la calidad, o para utilizarse en el marco de la procreación o cultivación mediando utilización de linajes consanguíneos por lo demás menos vitales, que está caracterizado porque las plantas útiles son tratadas mediante desinfección de la simiente, mediante riego de las hojas o mediante aplicación sobre el suelo, con uno o varios compuestos, que se habían identificado con ayuda del microconjunto de ADN, y/o de un compuesto ya conocido como antídoto.

Se prefieren en este contexto los compuestos que ya son conocidos en su utilización como los denominados antídotos en la protección de las plantas (fitoprotección), tal como por ejemplo tomados del conjunto de los compuestos conocidos como antídotos, que se componen de los compuestos de las fórmulas I-1 (mefenpir-dietilo), I-9 (isoxadifeno-etilo), II-1 (cloquintocet-mexilo), b-11 (fenclorim), b-14 (dimrón), VIII-3 (4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida); se prefieren muy especialmente los compuestos I-1 y VIII-3 (4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida).

Mediante una aplicación individual o combinada de los compuestos antes mencionados, las plantas útiles se pueden proteger de una manera efectiva frente a las repercusiones de agentes estresores abióticos, lo cual se manifiesta también en más altos rendimientos de las cosechas.

Es un objeto, por lo tanto, también un procedimiento para el aumento de la tolerancia de las plantas útiles en cultivos de plantas útiles frente a agentes estresores abióticos, mediante una aplicación individual o combinada de los compuestos identificados con ayuda del microconjunto de ADN, tomando en consideración el perfil de expresión de los genes de los compuestos identificados y/o de compuestos ya conocidos como antídotos.

Los siguientes Ejemplos describen el invento en particular.

Ejemplo 1

Detección del efecto de antídotos sobre unas plantas que habían sido sometidas a condiciones deliberadas de estrés por sequedad, mediante un perfilamiento de la expresión de genes (GEP, acrónimo del inglés "Gene Expression Profiling"):

Agente estresor abiótico = estrés por sequedad

Semillas de maíz de la variedad Lorenzo se desinfectaron con el compuesto 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida (= VIII-3).

Para esto, 10 g de semillas se incubaron mediando ligera agitación con 20 mg de la sustancia activa disuelta en 2 ml de cloruro de metileno, hasta que el disolvente hubo sido separado por evaporación (aproximadamente durante 30 min.). Las semillas del conjunto testigo fueron desinfectadas solamente con un disolvente.

A continuación las semillas tratadas se extendieron en macetas con tierra (diámetro: 10 cm, en cada caso 10 semillas por maceta) y las plántulas de maíz se cultivaron durante 10 días en una cámara climatizada en condiciones definidas de luz, humedad y temperatura [con luz blanca y día largo (16 h de claridad, 8 h de oscuridad), humedad del aire 70 %, 24°C]. Se utilizaron en cada caso 2 veces 10 macetas para los conjuntos testigos y para el ensayo de estrés por sequedad. Durante la cultivación, las plantas se regaron cada 2 días mediante estancamiento por abajo en una cuba durante 20 min. A los 10 días después de la germinación de las semillas, las plantas de maíz se sometieron a un estrés por sequedad. Para esto, las plantas del conjunto testigo 1 (sin ninguna desinfección con la sustancia activa) y el conjunto de ensayo (con una desinfección con la sustancia activa) se regaron solamente cada 7 días, tal como arriba se ha descrito. En el caso de las plantas del conjunto testigo 2 (sin ninguna desinfección con la sustancia activa) y de las del conjunto de ensayo 2 (con una desinfección con la sustancia activa) se mantuvo el esquema normal de riego. Después de 3 semanas en condiciones de estrés por sequedad, se evaluó el ensayo de la siguiente manera. Las partes de las plantas que estaban situadas por encima del terreno fueron recortadas y secadas durante una noche a 50°C. Al siguiente día se determinó la masa de hojas por maceta (masa seca) en [g].

Los valores medidos se promediaron a lo largo de las en cada caso 10 macetas del conjunto de plantas. Los valores numéricos indicados en la Tabla 1 son valores relativos en [%] referidos a los resultados de la medición del conjunto testigo 2 (sin ninguna desinfección con la sustancia activa, esquema normal de riego).

Conjunto de plantas:	Tratamiento:	Masa seca relativa [%]:
Conjunto testigo 1	-S/ +T	50
Conjunto testigo 2	-S/ -T	100
Conjunto de ensayo 1	+S/ +T	80
Conjunto de ensayo 2	+S/ -T	100

Tabla 1: Ensayo de estrés por sequedad con plantas de maíz sin y con desinfección con la sustancia activa
S = compuesto VIII-3 (4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)- bencenosulfonamida),
T = estrés por sequedad.

La masa seca promedia era igual en los casos de las plantas obtenidas a partir de semillas no desinfectadas y a partir de semillas desinfectadas sin condiciones de estrés (conjunto testigo 2, conjunto de ensayo 2).

Las plantas del conjunto con desinfección con el compuesto VIII-3 (4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)- bencenosulfonamida), mostraron en promedio un hábito más compacto que las plantas del conjunto testigo, que sin embargo no repercutía sobre la masa seca. Bajo un estrés por sequedad, la masa promedia de las hojas (masa seca) de las plantas desinfectadas con la sustancia activa había aumentado sin embargo significativamente en comparación con las plantas testigos sin desinfectar (conjunto testigo 1, conjunto de ensayo 1).

Ejemplo 2

Agente estresor abiótico = estrés por calor

Semillas de maíz de la variedad Lorenzo se desinfectaron como en el Ejemplo 1 con el compuesto 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida (= VIII-3) o respectivamente se trataron solamente con un disolvente sin ninguna sustancia activa. La cultivación de las plántulas se efectuó durante 10 días en una cámara climatizada en condiciones definidas, asimismo tal como se describe en el Ejemplo 1. Para el ensayo de estrés por calor se utilizaron 2 veces 10 macetas con plantas de maíz. El conjunto testigo se componía de las plantas sin desinfectar (con el disolvente) y el conjunto de ensayo se componía de las plantas desinfectadas con la sustancia activa. Para la aplicación de las condiciones de estrés por calor, ambos conjuntos de plantas se colocaron durante 2 días en un armario climatizado a 45°C, con luz blanca y día largo (16 h de claridad, 8 h de oscuridad), y se ajustó una humedad del aire de 70 %. Con el fin de evitar una desecación por causa de la alta temperatura, las plantas se regaron 1 vez por día por estancamiento por abajo en una cuba. Después del estrés por calor se pudo observar que – en especial en el conjunto testigo – los retoños de muchas plantas se habían doblado y las hojas se situaban de modo aplanado sobre el suelo.

El ensayo se evaluó cuantitativamente según los siguientes criterios.

Después del tratamiento por calor, las plantas dobladas se recontaron y se valoró el resultado por maceta:

< de 20 % de las plantas brotadas se habían doblado: daño débil
20 - 50 % de las plantas brotadas se habían doblado: daño mediano
> de 50 % de las plantas brotadas se habían doblado: daño fuerte



A continuación todas las plantas se cultivaron adicionalmente durante 2 semanas en condiciones normalizadas. Luego se midió el aumento de la longitud de las plantas individuales y se determinó la tasa de supervivencia de las plantas por cada maceta:

> de 50 % de tasa de supervivencia: daño débil
20-50 % de tasa de supervivencia: daño mediano
< de 20 % de tasa de supervivencia:daño fuerte



Los resultados de la evaluación de los ensayos se recopilan en la Tabla 2.

Las plantas testigos no desinfectadas fueron fuertemente dañadas por el estrés por calor. Eran llamativas en particular la doblez de los retoños en la mayor parte de las tandas así como la pequeña tasa de supervivencia. Las plantas de ensayo desinfectadas con la sustancia activa se caracterizaban especialmente por un estado (en inglés "standing") esencialmente mejor. En la valoración final era manifiesto ciertamente también en estas plantas el daño causado por el fuerte estrés por calor, pero la tasa de supervivencia era significativamente más alta que en el conjunto testigo.

Conjunto de plantas:	Tratamiento	
Conjunto testigo	-S/ +H	Evaluación intermedia (plantas dobladas):
		● ● ● ● ● ● ● ○ ○ ○
		Evaluación final (tasa de supervivencia):
		● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ○
Conjunto de ensayo	+S/ +H	Evaluación intermedia (plantas dobladas):
		○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
		Evaluación final (tasa de supervivencia):
		● ● ● ● ● ● ● ● ● ●

Tabla 2: Ensayo de estrés por sequedad con plantas de maíz sin y con desinfección con la sustancia activa
S = compuesto VIII-3 (4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil) bencenosulfonamida),
H = estrés por calor

Ejemplo 3

Agente estresor abiótico = estrés por frío (en un invernadero)

Semillas de maíz de la variedad Lorenzo se sembraron en macetas de 10 cm en tierra en cada caso con 10 semillas por maceta. Todos los conjuntos de ensayo se componían cada vez de 4 macetas. Las semillas sembradas de los conjuntos de ensayo 1 y 2 se rociaron antes del brote con 50 o respectivamente 100 [g de i.a./ha] del compuesto (4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-benceno-sulfonamida) (= VIII-3). Las semillas del conjunto testigo permanecieron sin tratar. Las plantas se cultivaron en condiciones controladas dentro de la cámara climatizada [con luz blanca, (día largo: 16 h de claridad, 8 h de oscuridad), temperatura diurna 22°C, temperatura nocturna 14°C, humedad del aire 60 %].

Después de la germinación, cuando las plantas hubieron alcanzado una altura de aproximadamente 1 cm, 2 macetas de cada conjunto se incubaron durante 6 h a -2°C en otra cámara climatizada en condiciones de estrés por frío. A continuación, estas plantas se colocaron de nuevo junto con las otras en la primera cámara climatizada.

Después de otras 24 h en condiciones normalizadas, el ensayo se evaluó. Se pudo observar que el estrés por frío provocaba clorosis en las puntas de las hojas de las plántulas del conjunto testigo sin tratar. Estos síntomas no se podían observar en absoluto o sólo muy limitadamente en las plantas tratadas con la sustancia activa.

Todas las plantas de los conjuntos de ensayo y del conjunto testigo, que exclusivamente se habían mantenido en condiciones normalizadas sin estrés por frío, no mostraron ningún síntoma de daño.

Para la evaluación cuantitativa del ensayo, se recontaron las plantas con aclaramientos en las puntas de las hojas.

El número total de las plantas por cada conjunto de ensayo y por cada tratamiento del estrés en frío era de 20 distribuidas cada vez en 2 macetas

Los resultados de la evaluación del ensayo se recopilan en la Tabla 3.

Conjunto de las plantas:	Tratamiento con la sustancia activa (antes del brote) [g de i.a./ha]:	Número de las plantas dañadas (con clorosis):
Conjunto testigo	0	9
Conjunto de ensayo 1	50	1
Conjunto de ensayo 2	100	0

Tabla 3: Ensayo de estrés por frío (en un invernadero) con plantas de maíz sin y con tratamiento con la sustancia activa con el compuesto VIII-3 (= 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida), antes del brote. Todas las plantas habían sido sometidas a un tratamiento de estrés por frío. El número total de las plantas por cada conjunto fue de 20.

Los resultados muestran que el tratamiento con la sustancia activa con el compuesto VIII-3 (= 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida), puede reducir manifiestamente los síntomas de

daño resultantes por causa del estrés por frío, o respectivamente en la dosificación más alta puede impedir totalmente la aparición de estos síntomas.

Ejemplo 4

Agente estresor abiótico = estrés por frío (en terreno al aire libre)

Semillas de maíz (Dent Corn) se desinfectaron con 0,003 mg y con 0,03 mg del compuesto 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida (= VIII-3) por cada g de semillas y se sembró sobre sendas parcelas de ensayo, cada una con un área de 34 m². Una parcela testigo contenía una simiente no desinfectada. Aproximadamente a los 8 días después del brote de las plantas sembradas, las plántulas estaban en el estadio de una sola hoja y fueron sometidas durante 5 días a las siguientes condiciones de temperaturas:

	Máximo:	Mínimo:
1º Día:	16,1°C	7,2°C
2º Día:	17,8°C	2,7°C
3º Día:	16,7°C	0,6°C
4º Día:	16,7°C	1,1°C
5º Día:	22,8°C	12,2°C

Después de este período de frío, las parcelas de ensayo se valoraron. En tal caso se evaluaron individualmente todas las plantas, y las plantas con por lo menos un 20 % de síntomas de frío, referido a la superficie total de las hojas (quemaduras y/o clorosis), se valoraron como dañadas.

Los resultados están recopilados en la Tabla 4. En la parcela testigo sin desinfección con la sustancia activa, todas las plantas (100 %) mostraron los síntomas de frío descritos. En las parcelas de ensayo con una desinfección con la sustancia activa, los daños por frío se habían reducido de una manera significativa.

Aquí se pudieron observar síntomas de daños solamente en aproximadamente un 12 % de las plantas. El máximo efecto de protección contra la helada se consiguió en la región de magnitud de las cantidades de desinfección con la sustancia activa que se indican en la Tabla.

Conjunto de las plantas:	Daños por frío [%]*:
Sin tratar	100
Desinfección con 0,003 mg de VIII-3 = 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida) por conjunto de semillas	12
Desinfección con 0,03 mg de VIII-3 = 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida) por conjunto de semillas	12

Tabla 4: Ensayo de estrés por frío sin y con desinfección con la sustancia activa con el compuesto VIII-3 (= 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida)

*: Proporción de las plantas con daños por frío > de 20 % referida al número total de las plantas en la parcela de ensayo.

Ejemplo 5

Caracterización de genes, que son inducidos por sustancias de ensayo en condiciones de un estrés abiótico, mediante perfilamiento de la expresión de genes (GEP):

Semillas de maíz de la variedad Lorenzo se desinfectaron, tal como se describe en el Ejemplo 1, con el compuesto VIII-3 (= 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida), o respectivamente con un disolvente. Las plantas se cultivaron durante 10 días en una cámara climatizada (condiciones: véanse en el Ejemplo 1). A continuación las plantas se sometieron a las siguientes condiciones de estrés:

- (1) Estrés por calor: 6 h a 45°C
- (2) Estrés por sequedad: 7 días sin riego, a 24°C.

Las plantas testigos del respectivo conjunto experimental se mantuvieron en las condiciones normalizadas (de temperatura, y riego) que se describen en el Ejemplo 1. Después del tratamiento por estrés, las hojas de las plantas estresadas así como las plantas testigos no estresadas se cosecharon, se congelaron por choque con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para el tratamiento. Todos los ensayos se llevaron a cabo en réplicas cada una con 2 macetas.

La producción de las sondas de ARN marcadas para la hibridación con un chip de ADN se efectuó de acuerdo con los protocolos (análisis de la expresión, manual técnico) de la entidad Affymetrix (Affymetrix Inc., 3380 Central Expressway, Santa Clara, CA, EE.UU.)). En cada caso a partir de 500 mg de las hojas cosechadas se aisló primeramente el ARN total. En cada caso 10 µg del ARN total se utilizaron para las síntesis de ADNc de primera cadena y de segunda cadena. El ADNc se amplificó con una polimerasa de T7 y en tal contexto se marcó al mismo tiempo con biotina-UTP. Cada vez 20 µg de este ADNc biotinilado se emplearon para la hibridación del conjunto de genoma de maíz de la entidad Affymetrix. Este microconjunto de ADN contiene unas secuencias de ADN, que en su totalidad representan a 13.339 genes. A continuación, los microconjuntos de ADN se lavaron en el puesto Affymetrix Fluidics Station, se tiñeron con estreptavidina / ficoeritrina (de Molecular Probes, P/N S-866) y se escanearon con el correspondiente escáner de láser de Agilent (Agilent Gene Array Scanner). Los datos de fluorescencia obtenidos se analizaron con el programa lógico Software Microarray Suite 5 de Affymetrix. Después de haberse efectuado un control de la calidad, todos los análisis con chips de ADN se almacenaron en un banco de datos. Con el fin de determinar los valores relativos de expresión (factores de inducción y de represión) se compararon los valores absolutos de expresión de los genes, procedentes de los respectivos experimentos de estrés, con los valores de los respectivos ensayos testigos (es decir, sin estrés abiótico y desinfección solamente con un disolvente) y se tomaron como base en tal caso los criterios de significancia previamente establecidos por el programa lógico de Affymetrix. Los en cada caso 4 valores de expresión por cada gen, obtenidos a partir de esto, se promediaron mediante cálculo de las medianas. Estas medianas se indican como factores de inducción en las Tablas de resultados. Las comparaciones de similitud de los perfiles de expresión de diferentes experimentos y de los análisis de racimos se llevaron a cabo con el programa lógico Software "Genedata Expressionist" de Genedata (Genedata, Maulbeerstr. 46, CH-4016 Basilea, Suiza).

En el caso del análisis de los perfiles de expresión se buscaron especialmente los genes que son inducidos por las sustancias de ensayo solamente en unión con un estrés abiótico, pero no lo son los inducidos por las sustancias o por un estrés a solas. Tales genes se pueden considerar como unos indicadores de adicionales efectos contra un estrés de las sustancias, que van más allá del efecto como antídoto ya conocido.

Los resultados de los análisis se exponen en las siguientes Tablas.

Los modelos de inducción de los genes indicadores descritos permiten el descubrimiento planificado de sustancias activas para el aumento de la tolerancia al estrés abiótico en plantas cultivadas.

a) En condiciones de estrés por calor, es decir que las plantas de maíz ensayadas (desinfectadas con 2 mg de i.a./g de semillas, de 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida) se sometieron durante 7 días después de la germinación durante 6 horas a una temperatura de 45°C.

Una inspección de los conjuntos de genes inducidos proporcionó el siguiente modelo representado en la Tabla 5:

Tabla 5

Nº de conjunto de muestra	Condición A	Condición B	Condición C
Zm.11840.1.A1_at	1,74	1,75	4,10
Zm.4274.1.S1_at	1,32	1,22	1,93
Zm.3040.1.S1_at	1,52	1,33	2,48
Zm12587.1.S1.s_at	1,30	1,45	2,33
Zm18994.2.A1_a_at	1,16	1,46	2,66
Zm.13498.1.S1_at	2,56	1,73	4,45

El respectivo Nº de conjunto de muestra corresponde:

Zm.11840.1.A1_at: Amido - hidrolasa de N-carbamil-L-aminoácido putativa
 Zm.4274.1.S1_at: Citocromo P450
 Zm.3040.1.S1_at: Uricasa II (E.C.1.7.3.3); uricasa específica de nódulos
 Zm12587.1.S1.s_at: Glicosil - transferasa
 Zm18994.2.A1_a_at: Serina - transferasa putativa
 Zm.13498.1.S1_at: Proteína membranar

Condición A: estrés por calor (6 horas, 45°C)

Condición B: semillas desinfectadas con 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida (VIII-3) / NINGÚN estrés por calor

Condición C: semillas desinfectadas con 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida (VIII-3) + estrés por calor (6 horas, 45°C).

Por consiguiente, incluso en el caso de una ligera inducción de base de las actividades analizadas de los genes, se observó en todos los casos un manifiesto aumento de la expresión de genes, que en el caso de los genes aquí mencionados estaba situado en el intervalo de 1,5 a 2,35 (expresión bajo la condición C / expresión bajo la condición A). Si el compuesto VIII-3 ensayado se ensayó a solas, es decir sin estrés por calor, entonces los niveles de

expresión medidos estaban situados en el intervalo de la región inducida por el estrés por calor, o por debajo o ligeramente por debajo de la región inducida por el estrés por calor.

Los modelos de inducción deducidos de la Tabla 5, que se representan directamente mediante los valores obtenidos de la expresión, muestran unas inducciones características mediante la acción del compuesto 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida (= VIII-3), siendo pronunciado del modo más fuerte el efecto sobre la amido - hidrolasa de N-carbamil-L-aminoácido putativa [Zm.11840.1.A1_at] y sobre la carboxi - peptidasa de serina putativa [Zm18994.2.A1-at]

b) En condiciones de estrés por sequedad, es decir que las plantas de maíz ensayadas (desinfectadas con 2 mg de i.a./g de semillas de 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida se sometieron durante 7 días después de la germinación durante 7 horas a una temperatura de 24°C.

Una inspección de los conjuntos de genes inducidos, proporcionó el siguiente modelo, representado en la Tabla 6

Tabla 6

Nº de conjunto de muestra	Condición A	Condición B	Condición C
Zm.818.1.A1_at	1,06	1,12	8,47
Zm.3633.4.A1_at	1,12	0,74	3,03
Zm.18273.1.S1_at	1,66	0,95	2,91
Zm.13229.1.S1_at	1,55	1,02	3,39
Zm.12035.1.A1_at	1,86	0,90	3,66
Zm.485.1.A1_at	0,89	1,00	5,49
Zm.818.2.A1_at	0,93	1,10	5,40
Zm.10097.1.A1_at	1,23	1,27	3,29
Zm.18682.1.A1_at	1,25	1,12	4,19

El respectivo Nº de conjunto de muestra corresponde a:

Zm.818.1.A1_at Proteína de estrés universal
 Zm.3633.4.A1_at Proteína inducida por heridas (fragmento)
 Zm.18273.1.S1_at Similar a proteína reguladora
 Zm.13229.1.S1_at Proteína O2 de resistencia a enfermedades del tipo NBS-LRR (fragmento)
 Zm.12035.1.A1_at Similar a AT3G10120
 Zm.485.1.A1_at Hemoglobina no simbiótica (HBT) (ZEAMP GLB1)
 Zm.818.2.A1_at Proteína expresada
 Zm.10097.1.A1_at Proteína expresada
 Zm.18682.1.A1_at Proteína desconocida

Condición A: Estrés por sequedad (7 días, 24°C)

Condición B: Semillas desinfectadas con 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida (VIII-3) / NINGÚN estrés por sequedad

Condición C: Semillas desinfectadas con 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida (VIII-3) + estrés por calor (7 días, 24°C)

Por consiguiente, incluso en el caso de una ligera inducción de base de las actividades analizadas de los genes en todos los casos, se observó un manifiesto aumento de la expresión de genes, que en el caso de los genes aquí mencionados está situada en el intervalo de 1,75 a 8,0 (expresión bajo la condición C / expresión bajo la condición A). Si el compuesto VIII-3 ensayado se ensayó a solas, es decir sin ningún estrés por sequedad, entonces los niveles de expresión medidos estaban situados en el intervalo de la región inducida por el estrés por sequedad, y en casos individuales incluso por debajo de la expresión de las plantas no estresadas (en el caso de valores < 1,0).

Los modelos de inducción deducidos de la Tabla 6, que se representan directamente por los valores obtenidos de la expresión, muestran unas inducciones características en presencia del compuesto 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida, siendo pronunciado del modo más fuerte el efecto sobre la proteína de estrés universal [Zm.818.1.A1_at] y sobre la hemoglobina (HBT) no simbiótica (ZEAMP GLB1) [Zm.485.1.A1_at].

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de compuestos, que ya son conocidos en su utilización como antidotos en la protección de las plantas, escogidos entre el conjunto que se compone de mefenpir-dietilo, isoxadifeno-etilo, y 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida, para el aumento del rendimiento de las cosechas en plantas cultivadas mediante aumento de la tolerancia frente al estrés por sequedad y/o por calor.
- 10 2. Utilización de compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, escogidos entre el conjunto que se compone de mefenpir-dietilo y 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida,
- 15 3. Utilización de compuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2 para el aumento del rendimiento de las cosechas mediante aumento de la tolerancia frente al estrés por sequedad y/o por calor en las plantas cultivadas maíz, trigo, cebada, centeno, avena, arroz, soja, girasol, colza y remolacha azucarera.
- 20 4. Procedimiento para el aumento del rendimiento de las cosechas en cultivos de plantas útiles, que son sometidas a un estrés por sequedad y/o por calor, caracterizado porque las plantas útiles son tratadas mediante desinfección de la simiente, mediante riego de las hojas o mediante aplicación sobre el suelo, con uno o varios compuestos, escogidos entre el conjunto que se compone de mefenpir-dietilo, isoxadifeno-etilo y 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el compuesto se escoge entre el conjunto que se compone de mefenpir-diºetilo y 4-ciclopropilaminocarbonil-N-(2-metoxibenzoil)-bencenosulfonamida.