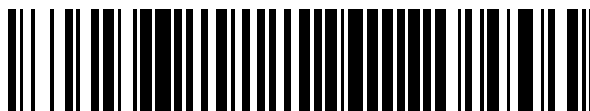


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 237**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C12P 19/44 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2002 E 02760774 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1421850**

54 Título: **Composiciones que inducen resistencia a enfermedades de plantas y procedimiento para producir las mismas**

30 Prioridad:

28.08.2001 JP 2001257800

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

08.04.2013

73 Titular/es:

**MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (100.0%)
4-16, Kyobashi 2-chome, Chuo-ku
Tokyo-To , JP**

72 Inventor/es:

**UMEMURA, KENJI;
USAMI, HIDEKI;
TOMODA, Y. y
TANINO, S.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 400 237 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que inducen resistencia a enfermedades de plantas y procedimiento para producir las mismas

La presente invención se refiere a un método para inducir resistencia a enfermedades en una planta diana, que usa micelios o cuerpos fructíferos de hongos filamentosos como material de partida. El método usado es respetuoso con el medio ambiente y es seguro para usuarios y consumidores.

Los métodos de control de enfermedades convencionales principales para productos agrícolas incluyen un método en el que se usa un pesticida químico tal como un fungicida o un agente de inhibición de la invasión, y un método en el que se usa un pesticida de microorganismos tal como microorganismos antagonistas o un organismo tal como un organismo enemigo natural.

En la mayoría de pesticidas químicos, las enfermedades se controlan mediante acción directa sobre hongos patógenos de plantas. Además de los pesticidas químicos, se usan pesticidas de tipo inducción de resistencia en los que se controlan enfermedades de cultivos potenciando la resistencia a enfermedades que tienen las plantas *per se*.

Los pesticidas, en la mayoría de casos, muestran una acción definitiva sobre los hongos patógenos de plantas. El uso continuo de estos pesticidas, en muchos casos, da como resultado la aparición de mutantes resistentes a los pesticidas. Por otro lado, los pesticidas de tipo inducción de resistencia controlan la infección de la enfermedad mediante la inducción de la resistencia de las plantas en vez de la acción directamente sobre los hongos patógenos de plantas. En virtud de este mecanismo, para los pesticidas de tipo inducción de resistencia, hasta ahora, no existe ningún informe sobre la aparición de mutantes resistentes. Por tanto, se considera que la influencia de los pesticidas de tipo inducción de resistencia sobre el medio ambiente incluyendo otros organismos es relativamente pequeña.

En la producción agrícola, se ha exigido el establecimiento de técnicas de producción agrícola sostenibles. Para cumplir esta exigencia, el desarrollo de materiales agrícolas respetuosos con el medio ambiente es una tarea importante.

Además, en los últimos años una exigencia creciente del consumidor de alimentos más seguros ha conducido a un aumento de una exigencia cada vez mayor de productos agrícolas orgánicos que se han cultivado aprovechando la función de ciclos naturales de la agricultura. Según las directrices publicadas por el Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca de Japón, los materiales utilizables en la producción de productos agrícolas orgánicos se limitan a materiales minerales útiles que se producen de manera natural, plantas, animales y sustancias naturales que se han eliminado, extraído o preparado a partir de los mismos. Cuando se desea el uso de los mismos como pesticidas, por ejemplo, para el control de enfermedades y plagas de insectos, únicamente pueden usarse pesticidas registrados basados en la Ley de Regulación de Productos Químicos Agrícolas, y no deben usarse antibióticos.

Por tanto, materiales de control utilizables en la producción de productos agrícolas orgánicos son limitados. Por tanto, se han deseado agentes de control de enfermedades altamente eficaces derivados de sustancias que se producen de manera natural como alternativa a los pesticidas químicos convencionales. El suministro de materiales agrícolas, que tienen los efectos de control de enfermedades de tipo inducción de resistencia anteriores, es decir, que pueden controlar de manera profiláctica enfermedades y se derivan de materiales que se producen de manera natural, podría producir pesticidas que son seguros para productores agrícolas así como usuarios y consumidores y, al mismo tiempo, puede reducir la carga medioambiental.

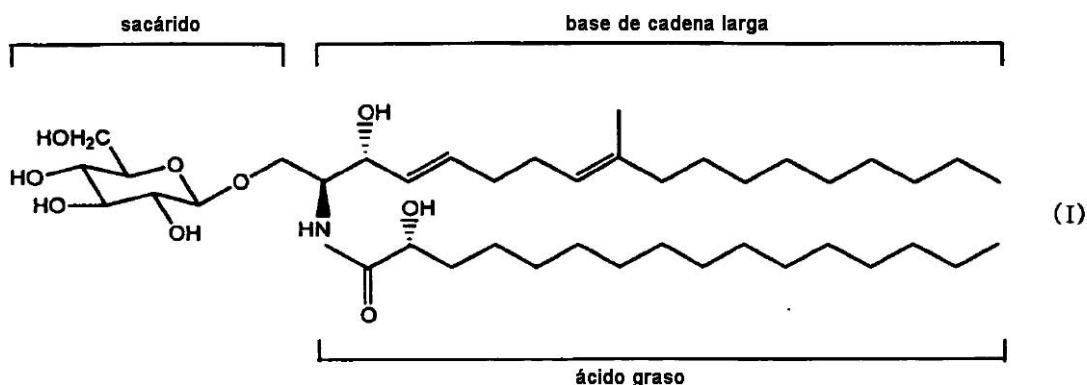
Hasta ahora, los pesticidas destinados a la inducción de resistencia a enfermedades de plantas se han limitado a "Oryzmate" (nombre genérico: probenazol, fabricado por Meiji Seika Kaisha Co., Ltd.) y "Bion" (nombre genérico: acibenzolar-S-metilo, fabricado por Novartis) que están registrados como agentes de control del añublo del arroz.

Se notifican inductores de fitoalexina tales como productos de descomposición de polisacáridos (publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 331016/1993) y derivados de ácido jasmónico (publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 29412/1999) como otras sustancias que inducen resistencia a enfermedades.

En los pesticidas anteriores para fines de inducción de resistencia a enfermedades, se proporciona un efecto de control contra diversas enfermedades de cultivos induciendo la resistencia de las plantas en vez de la acción directamente sobre hongos patógenos de plantas. Por tanto, hasta ahora, no existe ningún informe sobre la aparición de mutantes resistentes a estos pesticidas. Todos estos, sin embargo, son pesticidas sintetizados químicamente y por tanto no se adaptan a las directrices. Además, debe indicarse que, aunque los inductores de fitoalexina anteriores inducen la producción de fitoalexinas que es una reacción de resistencia a enfermedades de plantas, no existe ninguna descripción clara sobre un efecto de control de enfermedades práctico en las publicaciones anteriores.

Asimismo, se sabe que cerebrósidos que se ha notificado que son inductores de fitoalexina tienen un efecto de control sobre un nivel utilizable de manera práctica contra enfermedades del arroz (patente japonesa n.º 2846610 y documento WO 98/47364). Los cerebrósidos son una clase de glicoesfingolípidos y son glicolípidos en los que está unida una hexosa al alcohol primario de ceramidas a través de enlace glicosídico. Los glicoesfingolípidos están

5 presentes universalmente como constituyentes de membranas en diversas especies de organismos y ya se han usado como componentes cosméticos altamente seguros. Se ha considerado que los glicosfingolípidos que tienen actividad de inducción de resistencia a enfermedades se clasifican como cerebrósidos (Koga J. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 48 (27), 31985-31991). Se sabe que el cerebrósido B está distribuido en *Penicillium funiculosum* (Kawai G., Ikeda Y., Tubaki K. (1985) *Agric. Biol. Chem.* 49 (7), 2137-2146), *Lentinus edodes* (Kawai G (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1001 (2) 185-190), *Pachybasium sp.* (Sitrin R. *et al.* (1988) *J. Antibiot.* 41 (4), 469-480) y *Rhizoctonia sp.* (Umemura K. *et al.* *Plant Cell Physiology* 41(6), 676-683). El cerebrósido B tiene una estructura representada mediante la fórmula (I):



10 El cerebrósido B se da a conocer como agente de control de enfermedades del arroz en el documento WO 98/47364. El agente de control dado a conocer en esta patente es uno extraído de hongos patógenos de plantas. Además, debe indicarse que, hasta ahora, no existe ninguna notificación sobre el efecto de control de enfermedades de cerebrósido B y otros cerebrósidos contra productos agrícolas distintos de arroz.

15 Con respecto a la distribución de cerebrósidos en basidiomicetos, se sabe que los cerebrósidos están contenidos en un extracto etanólico de un cuerpo fructífero de seta Shiitake sin tratar (*Lentinus edodes*) (Kawai G (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1001(2) 185-190) y pueden extraerse cerebrósidos con acetona a partir de un micelio cultivado de *Schizophyllum commune Fr.* (publicación de patente japonesa n° 52878/1988). Sin embargo, la actividad de las sustancias descritas en las publicaciones anteriores es una actividad inductora de cuerpos fructíferos, y no se describe en las mismas ningún efecto de control contra enfermedades de plantas.

20 Con respecto a la utilización de extractos de basidiomicetos en labores de cultivo, por ejemplo, la publicación de patente japonesa n° 44040/1981 describe la utilización de los extractos para aumentar el rendimiento de productos agrícolas o para fines de promoción del crecimiento, y la publicación de patente japonesa n.º 48087/1982 describe la utilización de los extractos para la promoción de la pigmentación y la potenciación del contenido en azúcar en cítricos. Todas estas acciones, sin embargo, las muestran extractos acuosos.

25 En general, se sabe que la actividad de sustancias que inducen resistencia a enfermedades varía dependiendo de la especie de planta. Los glucanos, que son polímeros de glucosa, se conocen como ejemplos representativos de sustancias inductoras de resistencia derivadas de microorganismos que se han notificado hasta la fecha. Los glucanos que inducen la resistencia a enfermedades de soja no inducen ninguna reacción de resistencia en plantas de arroz. Por otro lado, los glucanos, que inducen la resistencia a enfermedades de plantas de arroz, no tienen ninguna capacidad de inducción de resistencia en soja (Sharp K. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 11321-11336 y Yamaguchi T. (2000) *Plant Cell* 12, 817-826), lo que indica que, a pesar de que las sustancias se clasificaron como glucanos, la reacción de especies de cultivo varía dependiendo de los métodos de polimerización. Además, se notifica que los ácidos araquidónicos inducen la resistencia de patatas (Bostock M. (1981) *Science* 212, 349-360). Sin embargo, no existe ninguna notificación sobre la inducción de resistencia en cultivos distintos de patatas. Por tanto, se considera que las sustancias inductoras de resistencia tienen actividad específica dependiente de la especie de cultivo.

35 En estas circunstancias, los presentes inventores han realizado estudios sobre una composición que induce resistencia a enfermedades de plantas que usa, como material de partida, una amplia variedad de hongos filamentosos incluyendo hongos comestibles y comprende, como componente activo, un glicosfingolípidos contenido en hongos filamentosos. Como resultado, han encontrado sorprendentemente que los glicosfingolípidos derivados de hongos filamentosos tienen un efecto de control contra enfermedades de plantas de arroz, así como contra enfermedades de diversas especies de cultivo distintas de plantas de arroz.

45 Además, los presentes inventores han encontrado que sustancias liposolubles, que se han extraído junto con glicosfingolípidos de hongos filamentosos, pueden actuar eficazmente como agente de extensión. Cuando se extraen glicosfingolípidos a partir de hongos filamentosos y se usan como componente activo, no hay necesidad de añadir nuevamente un agente de extensión puesto que las sustancias liposolubles también se extraen junto con los

glicoesfingolípidos. Esto es muy ventajoso desde los puntos de vista de la eficacia de trabajo y la reducción de costes. Los presentes inventores han encontrado además que una composición que contiene una sustancia liposoluble extraída de hongos filamentosos tiene un alto nivel de transferencia de penetración del componente activo a las plantas.

5 Además, los presentes inventores han encontrado que un extracto bruto proporcionado por extracción con un disolvente orgánico de hongos filamentosos que contienen glicoesfingolípidos tiene actividad inhibidora del crecimiento de plantas. Los presentes inventores han encontrado que las sustancias que tienen actividad fisiológicamente inhibidora contra plantas están contenidas como impureza de sustancias inductoras de resistencia en el extracto bruto de hongos filamentosos con un disolvente orgánico. Los presentes inventores han tenido éxito en eliminar eficazmente las sustancias fisiológicamente inhibidoras en una etapa de concentración/separación.

10 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para inducir resistencia a enfermedades en una planta diana usando una composición que comprende, como material de partida, hongos filamentosos seguros que tienen experiencia en la ingestión o similares, que no tiene ninguna actividad fisiológicamente inhibidora contra plantas, que tiene un espectro de control amplio con respecto a diversas especies de cultivo y es respetuoso con el medio ambiente.

15 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para inducir resistencia a enfermedades en una planta diana, que comprende la etapa de tratar la planta diana con una composición que comprende un glicoesfingolípido y una sustancia liposoluble obtenible mediante una etapa en la que se extraen junto con un disolvente orgánico que es acetato de etilo del hongo filamentosos, y luego concentrar el extracto obtenido mediante la extracción con el disolvente orgánico del hongo filamentosos y luego precipitar y eliminar sustancias que tienen actividad fisiológicamente inhibidora contra plantas, en el que dicho hongo filamentosos es un microorganismo que pertenece a basidiomicetos o un microorganismo para producción por fermentación que pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en género *Aspergillus*, género *Penicillium*, género *Trichoderma*, género *Acremonium*, género *Mucor* y género *Rhizopus*, y en el que dicho glicoesfingolípido es un cerebrósido que es uno cualquiera de cerebrósido A, cerebrósido B, cerebrósido C y cerebrósido O.

20 Un procedimiento para producir la composición usada en el método según la presente invención, comprende las etapas de: agitar micelios o cuerpos fructíferos de un hongo filamentosos sumergidos en un disolvente orgánico para extraer un glicoesfingolípido y una sustancia liposoluble en el disolvente orgánico (etapa de extracción con disolvente orgánico); y concentrar el extracto proporcionado por la extracción con disolvente orgánico en la etapa de extracción y luego precipitar y eliminar sustancias, que tienen actividad fisiológicamente inhibidora contra plantas, contenidas en el extracto (etapa de concentración/separación).

30 Los "glicoesfingolípidos" son compuestos que comprenden una base de cadena larga, un ácido graso y un sacárido tal como se representa mediante la fórmula (I). En este contexto, el tipo de sacárido y el número de sacáridos no están particularmente limitados.

35 Los "cerebrósidos" son glicoesfingolípidos en los que la parte de sacárido es hexosa.

40 La estructura de los cerebrósidos derivados de hongos filamentosos usado en la presente invención se caracteriza por tener un grupo metilo unido a la posición 9 de la parte de base de cadena larga (Kawai G., Ikeda Y., Tubaki K. (1985) Agric. Biol. Chem. 49 (7), 2137-2146 y Kawai G (1989) Biochim. Biophys. Acta 1001 (2) 185-190). Se sabe que la estructura está implicada en la actividad inductora de resistencia a enfermedades del arroz (Koga J. *et al.* (1998) J. Biol. Chem. 48 (27), 31985-31991 y Umemura K. *et al.* (2000) Plant Cell Physiol. 41 (6), 676-683). Por tanto, en la presente invención, el término "glicoesfingolípido derivado de hongos filamentosos" se refiere a un glicoesfingolípido en el que un grupo metilo está unido a la posición 9 de la parte de base de cadena larga. Además, en la presente invención, los "cerebrósidos derivados de hongos filamentosos" usados son cerebrósidos en los que un grupo metilo está unido a la posición 9 de la parte de base de cadena larga.

45 Los cerebrósidos derivados de hongos filamentosos son los siguientes cerebrósidos:

cerebrósido A ((4E,8E)-N-D-2'-hidroxi-(E)-3'-hexadecenoil-1-O-β-D-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingadienina);

cerebrósido B ((4E,8E)-N-D-2'-hidroxipalmitoil-1-O-β-D-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingadienina);

cerebrósido C ((4E,8E)-N-D-2'-hidroxi-(E)-3'-octadecenoil-1-O-β-D-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingadienina); y

cerebrósido D ((4E,8E)-N-D-2'-hidroxiestearoil-1-O-β-D-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingadienina).

50 La composición según la presente invención puede comprender cerebrósido A, cerebrósido B, cerebrósido C y cerebrósido D o bien individualmente o bien en una combinación de dos o más.

Los cerebrósidos contenidos como componente activo en la composición según la presente invención pueden prepararse de micelios o cuerpos fructíferos de hongos filamentosos.

Los hongos filamentosos son microorganismos que pertenecen a basidiomicetos y microorganismos para producción por fermentación tal como producción de enzimas, producción de antibióticos y producción de polisacáridos.

5 Los basidiomicetos incluyen basidiomicetos comestibles tales como microorganismos que pertenecen al género *Pleurotus*, género *Lentinus*, género *Flammulina*, género *Grifola*, género *Agaricus*, género *Auriculariales*, género *Tremellales*, género *Pholiota* y género *Sparassidaceae*, y basidiomicetos de uso médico tales como microorganismos que pertenecen al género *Wolfiporia* o género *Ganoderma*. Los microorganismos para producción por fermentación son los que pertenecen al género *Aspergillus*, género *Penicillium*, género *Trichoderma*, género *Acremonium*, género *Mucor* y género *Rhizopus*. Los ejemplos de basidiomicetos preferidos utilizables en el presente documento incluyen *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus campestris* y *Auricularia polytricha*. Los ejemplos de microorganismos preferidos para producción por fermentación incluyen *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Penicillium roquefortii*.

Los micelios o cuerpos fructíferos de hongos filamentosos pueden ser, por ejemplo, células en viales, disolución de cultivo de células, concentrado de disolución de cultivo, células secadas o producto procesado de los mismos incluyendo residuo de fermentación o similares. Se prefieren células secadas de cuerpos fructíferos.

15 Cuando se usan células secadas de hongos filamentosos, la molienda de las células secadas por medio de una máquina de molienda tal como un molino de potencia hasta tal punto que un disolvente puede infiltrarse fácilmente en las células secadas puede producir la extracción con alta eficacia. Se prefiere una molienda fina hasta tal punto que las partículas pasan a través de un tamiz que tiene una abertura de aproximadamente 2 mm desde el punto de vista de la producción de la extracción con eficacia superior.

20 Un procedimiento para producir una composición que induce resistencia a enfermedades de plantas usado en el método de la presente invención, comprende las etapas de: agitar micelios o cuerpos fructíferos de un hongo filamentosos sumergidos en un disolvente orgánico para extraer componentes contenidos en las células en el disolvente orgánico (etapa de extracción con disolvente orgánico); y concentrar el extracto proporcionado mediante la extracción con disolvente orgánico en la etapa de extracción y luego precipitar y eliminar sustancias, que tienen actividad fisiológicamente inhibidora contra plantas, contenidas en el extracto (etapa de concentración/separación).
25 La composición así obtenida comprende un glicoesfingolípido como componente activo y una sustancia liposoluble como componente de extensión.

En la presente invención, el término "sustancia liposoluble" se refiere a una sustancia que puede hacerse soluble en grasas y aceites y muchas de tales sustancias liposolubles pueden extraerse con un disolvente orgánico, por ejemplo acetato de etilo. La sustancia liposoluble puede determinarse simplemente de manera cuantitativa mediante extracción y determinación usando n-hexano. La sustancia liposoluble derivada de micelios o cuerpos fructíferos de hongos filamentosos puede extraerse de hongos filamentosos simultáneamente con la extracción de glicoesfingolípidos como componente activo. La sustancia liposoluble extraída contiene una sustancia anfipática que tiene actividad de extensión que, tras la aplicación de la composición, puede mejorar la extensión de la composición sobre las hojas. Por tanto, puede potenciarse la transferencia de extensión y penetración del glicoesfingolípido como componente activo sobre el cuerpo de la planta. En la composición que induce resistencia a enfermedades de plantas según la presente invención, cuando el componente activo se extrae de hongos filamentosos, el extracto contiene un componente de extensión. Por tanto, no se requiere la adición de ningún agente de extensión adicional al momento de la aplicación. Incluso si se requiere el uso de un agente de extensión adicional, la adición de solamente una pequeña cantidad del agente de extensión es suficiente para lograr los resultados contemplados. Esto es ventajoso desde los puntos de vista de la eficacia de trabajo y la reducción de costes y, al mismo tiempo, puede reducir la influencia sobre el medio ambiente.

En la etapa de extracción, se añade un disolvente orgánico, por ejemplo acetato de etilo, al hongo filamentosos, se agita la mezcla y, tras la finalización de la extracción del componente activo, se lleva a cabo una separación sólido-líquido para su separación en un extracto de disolvente orgánico y el residuo para proporcionar el extracto de disolvente orgánico. Un disolvente orgánico utilizable en la etapa de extracción es acetato de etilo.

Se seleccionan condiciones de extracción apropiadas según el estado del hongo filamentosos. La temperatura del líquido en la extracción es preferiblemente de 15 a 80°C. Además, con el fin de mejorar el rendimiento, el residuo puede volverse a extraer para obtener adicionalmente el componente activo. Con este fin, puede adoptarse un método en el que se añade de nuevo un disolvente orgánico al residuo tras la separación sólido-líquido para sumergir el residuo en el disolvente orgánico, y se somete la mezcla a separación sólido-líquido para separar un extracto de disolvente orgánico que se añade entonces al extracto de disolvente orgánico previamente obtenido.

En la etapa de concentración/separación, se concentra el extracto de disolvente orgánico para potenciar el contenido del componente activo y el componente de extensión y, al mismo tiempo, para eliminar sustancias que tienen actividad fisiológicamente inhibidora contra plantas.

La concentración puede llevarse a cabo mediante un método convencional tal como secado por congelación, concentración a vacío o destilación por calor. Puesto que, sin embargo, la concentración a temperaturas elevadas es desfavorable, se prefiere la concentración a vacío. En el caso de la destilación por calor, la concentración se lleva a

cabo a una temperatura de hasta 80°C.

La concentración puede llevarse a cabo de modo que, en el concentrado, el contenido en cerebrósido B es preferiblemente de 0,4 a 3,0 mg/ml, más preferiblemente de 0,9 a 3,0 mg/ml y el contenido en sustancia liposoluble en cuanto a extracto de n-hexano es preferiblemente de 10 a 200 mg/ml, más preferiblemente de 30 a 100 mg/ml.

5 Por norma, la concentración puede llevarse a cabo usando, como índice, el contenido de un cerebrósido distinto de cerebrósido B. En la concentración, el volumen se reduce preferiblemente a de un quinto a un treintavo, más preferiblemente de un décimo a un veinteavo del volumen antes de la concentración.

En el concentrado, cuando el contenido en sustancia liposoluble en cuanto a un extracto de n-hexano es inferior a 10 mg/ml, el componente que tiene actividad fisiológicamente inhibidora contra plantas no puede eliminarse a veces como precipitado. Por otro lado, la concentración excesiva hasta un contenido en sustancia liposoluble superior a 200 mg/ml provoca algunas veces la separación del sustrato liposoluble tras la dilución, lo que hace imposible proporcionar un componente homogéneo.

La formulación de la composición que induce resistencia a enfermedades de plantas usada en el método según la presente invención puede ser una cualquiera adoptada en pesticidas, y ejemplos de la misma incluyen formulaciones líquidas, polvo, gránulos, concentrados emulsionables, polvo humectable, disoluciones oleosas, aerosoles y suspensiones concentradas. La forma del producto químico para aplicación, forma de aplicación y método de aplicación no están tampoco particularmente limitados. La concentración de la composición en el momento de la aplicación es, sin embargo, preferiblemente de 0,5 a 100 µg/ml, más preferiblemente de 1 a 50 µg/ml, de manera particularmente preferible de 5 a 20 µg/ml, en cuanto al contenido de cerebrósidos. La concentración de aplicación, sin embargo, puede regularse hasta un valor apropiado dependiendo del tipo de plantas, fase de crecimiento y método de aplicación.

La composición que induce resistencia a enfermedades de plantas usada en el método según la presente invención puede usarse para la protección de todas las plantas de cultivo y los ejemplos de tales plantas de cultivo incluyen cereales (por ejemplo, arroz, cebada, trigo y maíz), plantas solanáceas (por ejemplo, tomates, berenjena y patatas), plantas cucurbitáceas (por ejemplo, pepinos, melones y calabazas), plantas leguminosas (por ejemplo, guisantes y soja), plantas crucíferas (por ejemplo, rábanos japoneses, coles chinas y coles), plantas rosáceas (por ejemplo, fresas, manzanas y peras), plantas compuestas (por ejemplo, lechugas), plantas convolvuláceas (por ejemplo, boniatos), plantas umbelíferas (por ejemplo, zanahorias, perejil y apio) y plantas vitáceas (por ejemplo, vid). En plantas, se considera que una reacción de resistencia a enfermedades general no es específica para hongos patógenos. Por tanto, todas las enfermedades de plantas inducidas por hongos filamentosos pueden mencionarse como enfermedades diana de los cultivos anteriores, y ejemplos de las mismas incluyen el hongo de añublo del arroz (*Magnaporthe grisea*), hongo del tizón de las hojas del arroz del sur (*Cochliobolus miyabeanus*), hongo del brazo muerto del boniato (*Fusarium oxysporum*), hongo del brazo muerto del melón (*Fusarium oxysporum* f. sp. melonis), hongo de la podredumbre de la raíz de lechuga (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*) y hongo del marchitamiento por *Verticillium* del tomate (*Verticillium dahliae*).

Además, en una realización preferida de la presente invención, la composición usada en el método de la invención comprende glicosfingolípido derivado de hongos filamentosos y sustancia liposoluble, comprendiendo el glicosfingolípido cerebrósido B, siendo el contenido de cerebrósido B de 0,4 a 3,0 mg/ml, siendo el contenido de la sustancia liposoluble de 10 a 200 mg/ml en cuanto a un extracto de n-hexano.

40 Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no pretenden ser una limitación de la invención.

Ejemplo 1: Producción de una composición que induce resistencia a enfermedades de plantas

(1) Etapa de extracción con disolvente orgánico

45 Se molió una seta shiitake secada (*Lentinus edodes*) en un molino de potencia (molino de potencia de mesa P-02, fabricado por SHOWA GIKEN INDUSTRIAL CO., LTD.) y se recogió un producto molido a través de un tamiz que tenía un tamaño de abertura de 1,0 mm. A 1 kg del producto molido de la seta shiitake seca se le añadieron 5 litros de etanol al 99,5%. Se mantuvo la mezcla a 25°C y se llevó a cabo la extracción durante 24 h con agitación, seguido por separación sólido-líquido para dar un primer extracto etanólico y el residuo. Además, se sumergió el residuo en 50 5 litros de etanol al 99,5% durante 30 min. para lavar el residuo, seguido por separación para dar un segundo extracto etanólico y el residuo. Se combinaron entre sí los extractos etanólicos primero y segundo para proporcionar un extracto etanólico.

(2) Etapa de concentración/separación

55 Se concentró el extracto etanólico combinado proporcionado en la etapa de extracción con disolvente orgánico bajo presión atmosférica a una temperatura del líquido de 80°C hasta que el volumen del líquido era de aproximadamente un veinteavo del volumen inicial. Tras la concentración, se enfrió el concentrado hasta temperatura ambiente y se

5 eliminó el precipitado resultante en el líquido mediante centrifugación para proporcionar aproximadamente 80 ml de concentrado de extracto etanólico A. Se determinó el contenido de sustancias liposolubles en el concentrado de extracto etanólico A mediante un método de n-hexano, y se determinó el contenido de cerebrósido B en el concentrado de extracto etanólico A mediante un método de HPLC. Como resultado, se encontró que el contenido en sustancia liposoluble y el contenido en cerebrósido B eran de 100 mg/ml y de 2,2 mg/ml, respectivamente.

(3) Análisis del extracto

Se analizó el extracto obtenido anteriormente tal como sigue.

10 Se analizó el extracto mediante HPLC usando una columna TSKgel ODS 120A (fabricada por Tosoh Corporation; 4,6 mm x 300 mm) para determinar el contenido en cerebrósido B y el contenido en cerebrósido D. En el análisis, en condiciones de temperatura de columna de 50°C, disolvente de etanol al 80% y velocidad de flujo de 1 ml/min., se determinaron cuantitativamente las cantidades de sustancias detectadas mediante UV a 215 nm en tiempos de retención de 20,8 min. y 24,6 min. respectivamente como contenido en cerebrósido B y contenido en cerebrósido D.

15 Se determinó el contenido en sustancia liposoluble como un extracto de n-hexano (según una tabla adjunta a la notificación n.º 28 de la Agencia Medioambiental de Japón en 1985). Específicamente, se colocaron 50 ml de agua desionizada en un embudo de decantación de 100 ml y se añadió 1 ml de una disolución de muestra al agua desionizada. Posteriormente, se añadieron a la misma 10 ml de n-hexano y 0,5 g de NaCl, y se agitó la mezcla y se dejó reposar. Tras la separación, se eliminó la fase inferior y se añadieron de nuevo 50 ml de agua para lavar con agua. Se repitió dos veces este lavado con agua y se recuperó la fase de hexano. Se añadió una cantidad satisfactoria de sulfato de sodio anhidro a la fase de hexano para la deshidratación. Se filtró entonces la mezcla a través de papel filtro n.º 2 (marca comercial; ADVANTEC, fabricado por Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) y se lavó el papel de filtro con una cantidad menor de hexano. Se transfirió el extracto a un recipiente de evaporación y se evaporó sobre una placa caliente de 80°C, seguido por secado en una secadora (80°C). Se pesó el producto secado como un extracto de n-hexano.

Ejemplo 2:

25 Para la comparación de la tasa de extracción de cerebrósidos entre disolventes orgánicos diferentes, se midieron las cantidades de cerebrósido B y cerebrósido D extraídas de una seta shiitake sin tratar para determinar el contenido en cerebrósido B y cerebrósido D del extracto. Se usaron metanol, etanol, cloroformo, acetona, n-hexano y acetato de etilo como disolventes orgánicos de comparación. Se añadieron cada disolvente (150 ml) y 30 ml de agua a 100 g de la seta shiitake sin tratar que se trituró entonces en una mezcladora con riego (Ace Homogenizer AM-7, fabricada por Nihon Seiki Seisakusho Co., Ltd). Se transfirió el líquido triturado a un tubo de sedimentación centrífuga y se agitó entonces en un agitador (un agitador recíproco de centrifugación R-30, fabricado por TIETECH Co., Ltd.) durante 12 h para extraer cerebrósidos en la fase de disolvente orgánico. Se midieron las cantidades de cerebrósidos extraídos con disolvente mediante la HPLC anterior y se expresaron en cuanto a las cantidades de cerebrósido B y cerebrósido D por g de la seta shiitake sin tratar. Se muestran los resultados en la tabla 1. Se encontró que varias clases de cerebrósidos distintos de cerebrósido B y cerebrósido D estaban contenidos en el extracto (datos omitidos). Estos cerebrósidos correspondían a Kawai *et al.* (Biochimica et Biophysica Acta, 1001, 1989, 185-190) Len I a X.

Tabla 1

	Extracción con metanol	Extracción con etanol	Extracción con cloroformo	Extracción con acetona	Extracción con n-hexano	Extracción con acetato de etilo
Contenido en cerebrósido B, µg/g	25,6	28,8	35,6	25,8	27,8	50,4
Contenido en cerebrósido D, µg/g	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,6

40 Ejemplo 3: Relación entre el contenido en cerebrósido B, el contenido en lípidos y la razón de concentración y el valor protector para el añublo del arroz

45 Se examinaron concentrados con concentraciones respectivas proporcionados en el transcurso de la preparación de concentrado de extracto etanólico A en el ejemplo 1 y una disolución obtenida concentrando adicionalmente concentrado de extracto A para determinar el contenido en sustancia liposoluble, el contenido en cerebrósido B y el efecto de control para el añublo del arroz. Para las concentraciones de los concentrados individuales, se consideró el extracto etanólico tras la finalización de la etapa de extracción como una disolución diluida una vez, y se consideró la razón de la cantidad del líquido tras la finalización de la extracción con respecto a la cantidad del líquido tras cada operación de concentración en la etapa de concentración/separación como la razón de concentración. De esta manera, se proporcionaron disoluciones diluidas 1, 2, 5, 10, 20, 30 y 50 veces para la prueba. Se expresó el contenido en sustancia liposoluble en cuanto a un extracto de n-hexano. Además, para los líquidos individuales, se

compararon la capacidad de extensión de los líquidos de prueba, el estado de los líquidos tras la dilución, el estado de la superficie foliar como el nivel de trastorno fisiológico de las hojas a las que se aplicó el líquido.

5 Para examinar el efecto de control de la enfermedad, se llevó a cabo una prueba de evaluación mediante el siguiente método. Específicamente, se sembraron 8 semillas de arroz germinadas de manera forzada (variedad: Akitakomachi) por maceta y se hicieron crecer en una sala con aire acondicionado, y se pulverizó la muestra sobre la planta con estadio de edad foliar de 3 a 4 en hojas verdaderas. En este caso, se proporcionaron cinco macetas por parcela, y se trató la planta con un líquido preparado diluyendo una disolución con cada razón de concentración hasta 10 ppm en cuanto a cerebrósido B. Para la prueba de comparación, se trató la planta con un líquido preparado diluyendo una muestra patrón de cerebrósido B hasta 10 ppm. Se aplicó el líquido de prueba (2 ml por maceta) al follaje, y se dejó reposar la planta durante una h hasta que se llevó el líquido de prueba sobre el follaje a un estado seco y se hizo crecer entonces de nuevo en la sala con aire acondicionado. La muestra patrón de cerebrósido B era una muestra patrón (disolución de cerebrósido B 2 mg/ml) (Plant Cell Physiology 41 (6), 676-683 (2000)) separada y purificada mediante el método de Umemura *et al.*

15 Tres días tras el tratamiento de la muestra, se llevó a cabo el tratamiento con infección mediante inoculación por pulverización de una suspensión de conidios del hongo de añublo del arroz (*Magnaporthe grisea*, raza: 007). Tras la inoculación por pulverización, se dejó reposar la planta en condiciones humidificadas y de oscuridad durante 36 h para infectar la planta con el hongo del añublo del arroz. Después de eso, se transfirió la planta a la sala con aire acondicionado para su crecimiento. Cinco días tras la inoculación, se contó el número de lesiones de la enfermedad producidas en la tercera hoja verdadera en cada parcela para calcular el valor protector. Se calculó el valor protector mediante la siguiente ecuación: valor protector = (1 - número promedio de lesiones por hoja en parcela de tratamiento/número promedio de lesiones por hoja en parcela control) x 100. Para la parcela control, se pulverizó agua en una cantidad de 2 ml por maceta.

25 Se resumen los resultados en la tabla 2. Cuando se usaron las muestras con bajas razones de concentración, se alteró el color del follaje, indicando que la planta presentaba el trastorno. Por otro lado, cuando se usaron las muestras con altas razones de concentración, se someten los líquidos diluidos a separación, lo que deteriora el valor protector y la funcionalidad. Desde una perspectiva exhaustiva del estado del follaje, la capacidad de extensión, el estado del líquido tras la dilución y el valor protector, se considera que el extracto se concentre preferiblemente para proporcionar una concentración de cerebrósido B de 0,4 a 3,0 mg/ml y un contenido en sustancia liposoluble de 10 a 200 mg/ml en cuanto a un extracto de n-hexano.

30 Tabla 2

Razón de concentración	1 (justo después de la extracción)	2	5	10	20 (extracto A)	30	50	Muestra convencional de cerebrósido B
Contenido en cerebrósido B, mg/ml	0,09	0,18	0,45	0,89	1,87	2,89	4,96	-
Sustancia liposoluble, mg/ml	3	7	14	32	68	98	219	-
Valor protector	80	85	88	91	92	93	70	90
Capacidad de extensión	O	O	O	O	O	O	O	X
Estado de la superficie foliar	X	X	Δ	O	O	O	O	O
Estado del líquido tras la dilución	O	O	O	O	O	Δ	X	O

Capacidad de extensión: O normal, X repelente del agua.

Estado de la superficie foliar: O normal, X amarillento o color alterado debido al trastorno, Δ color parcialmente alterado.

Estado del líquido tras la dilución: O normal, X aceite separado, Δ parcialmente separado.

35 Ejemplo 4: Prueba de control del añublo del arroz

(1) Método

40 Se evaluó el efecto de control de la misma manera que en el ejemplo 3. Se diluyó concentrado de extracto etanólico A preparado en el ejemplo 1 con agua para proporcionar un líquido diluido 300 veces (10 ppm en cuanto a cerebrósido B), y se aplicó el líquido de prueba en una cantidad de 2 ml por maceta al follaje de la parcela de tratamiento con líquido de prueba (A). Por otro lado, se añadió el 0,1% de Tween 20 como agente de extensión a una disolución de 10 ppm de cerebrósido B para proporcionar un líquido de prueba. Se aplicó este líquido de prueba en una cantidad de 2 ml por maceta al follaje en la parcela de tratamiento con líquido de prueba (B).

(2) Resultados

Se muestran los resultados en la tabla 3. Para la parcela control, el número promedio de lesiones por hoja era de 18,6; para la parcela de tratamiento con cerebrósido B (B), el número promedio de lesiones por hoja era de 2,3; y, para la parcela de tratamiento de concentrado de extracto etanólico A (A), el número promedio de lesiones por hoja era de 1,8, indicando que, en todas las parcelas, se observó un efecto inhibitor del desarrollo de la enfermedad significativo. Para el valor protector, la parcela de tratamiento con concentrado de extracto etanólico A (A) según la presente invención era superior a la parcela de tratamiento con cerebrósido B (B) (con agente de extensión Tween 20 añadido a la misma).

Tabla 3

	Parcela experimental A	Parcela comparativa B	Parcela control
Número de lesiones	1,8	2,3	18,6
Valor protector	90,3	87,6	0

10 Ejemplo 5: Prueba de control de la mancha parda del arroz

(1) Método

De la misma manera (cultivo de planta de prueba, método de tratamiento de muestras y concentración de tratamiento, y método de infección con hongo patógeno) que en la prueba de control del añublo del arroz en el ejemplo 3, se examinó el efecto de control contra las manchas pardas del arroz en la parcela de tratamiento con concentrado de extracto etanólico A (A) y la parcela de tratamiento con cerebrósido B (B). Se llevó a cabo el recuento del número de lesiones dos días tras la inoculación por pulverización de una suspensión de conidios del hongo de la mancha parda (*Cochliobolus miyabeanus*).

(2) Resultados

Se muestran los resultados en la tabla 4. Para la parcela control, el número promedio de lesiones por hoja era de 10,2; para la parcela de tratamiento con cerebrósido B (B), el número promedio de lesiones por hoja era de 1,3; y, para la parcela de tratamiento con concentrado de extracto etanólico A (A), el número promedio de lesiones por hoja era de 0,9, indicando que se observó un efecto inhibitor de desarrollo de la enfermedad significativo. Para el efecto inhibitor, la parcela de tratamiento con concentrado de extracto etanólico A era mejor que la parcela de tratamiento con cerebrósido B.

Tabla 4

	Parcela experimental A	Parcela comparativa B	Parcela control
Número de lesiones	0,9	1,3	10,2
Valor protector	91,1	87,3	0

25 Ejemplo 6: Prueba de campo para el control del añublo del arroz

(1) Método

Se dividió aleatoriamente un campo de cultivo de arroz en una región en la que tiene se encuentra habitualmente el añublo en parcelas de prueba (cada una de 24 m²). En los días 44 y 51 tras el trasplante del arroz en plántulas (variedad: Koshihikari), se llevó a cabo el tratamiento de aplicación de líquido de prueba. Se llevó a cabo un tratamiento por pulverización en 120 l/10 áreas para cada 3 bloques por parcela. Las muestras en parcelas individuales fueron tal como sigue. Se trató la parcela experimental (E) con un líquido (concentración: 20 ppm en cuanto a cerebrósido B) preparado diluyendo concentrado de extracto etanólico A preparado en el ejemplo 1 con agua 150 veces. Se trató la parcela de comparación (F) con una disolución de cerebrósido B que tenía una concentración de cerebrósido B de 20 ppm y que contenía, añadido a la misma, de aproximadamente el 0,02 al 0,03% de Mylinow (Mairinou) (fabricado por Nihon Nohyaku Co., Ltd.) como agente de extensión. Se trató la parcela de comparación (G) con un líquido preparado añadiendo de aproximadamente el 0,02 al 0,03% de Mylinow (fabricado por Nihon Nohyaku Co., Ltd.) como agente de extensión a un líquido diluido 1000 veces de Rabcide Flowable (fabricado por Kureha Chemical Industry Co., Ltd.) (componente activo: 500 ppm de ftalida).

40 (2) Resultados

Un mes tras la aplicación inicial, se investigaron las plantas para determinar el desarrollo de añublo en hojas, y se realizó la comparación de las parcelas en cuanto a valor protector determinado a partir del porcentaje de desarrollo de enfermedad. Se muestran los resultados en la tabla 5. El valor protector era de 95 para la parcela de tratamiento con concentrado de extracto etanólico A (E), de 93 para la parcela de tratamiento con cerebrósido B (F) y de 94 para

la parcela de comparación (G), indicando que estas muestras son eficaces para el control del añublo del arroz. Además, el valor protector en la parcela de tratamiento con concentrado de extracto etanólico A (E) fue superior al de la parcela de tratamiento con cerebrósido B (F). Por tanto, pudo confirmarse que, en un campo de cultivo real, el efecto logrado por la composición que induce resistencia a enfermedades de plantas según la presente invención utilizable en el cultivo de productos agrícolas orgánicos es igual o superior al logrado mediante productos químicos agrícolas.

Tabla 5

	Parcela experimental E	Parcela de comparación F	Parcela de comparación G	Parcela control
Valor protector	95	93	94	0

Ejemplo 7: Prueba de control de la podredumbre del tallo del boniato

(1) Método

Se sumergieron las partes radicales de boniatos en plántulas (variedad: Benikomachi) infectadas con hongo del brazo muerto del boniato (*Fusarium oxysporum*) en cada disolución de muestra durante 30 min. antes de plantar en un campo. Se trataron parcelas individuales mediante los siguientes líquidos de muestra. Se trató la parcela experimental (E) con un líquido (concentración: 20 ppm en cuanto a cerebrósido B) preparado diluyendo concentrado de extracto etanólico A preparado en el ejemplo 1 150 veces. Se trató la parcela de comparación (H) con un líquido que tenía una concentración de cerebrósido B de 20 ppm. El número de plantas por parcela fue de 20, y una parcela consistía en cuatro bloques que se proporcionaron a intervalos de 60 cm. En este estado, se trasplantaron las plantas al campo.

(2) Resultados

Se investigó el porcentaje de desarrollo de enfermedad de raíces 26 días tras el trasplante, y se calculó el valor protector del porcentaje de desarrollo de enfermedad promedio de raíces. Se muestran los resultados en la tabla 6. El valor protector era de 79 para la parcela de tratamiento con concentrado de extracto etanólico A (E) y de 70 para la parcela de tratamiento con cerebrósido B (H). Por tanto, pudo confirmarse que la composición que induce resistencia a enfermedades según la presente invención también tiene un efecto de control contra enfermedad del suelo. Puesto que hay pocos o ningún fungicida eficaz para la enfermedad del suelo, se dice que el control de la enfermedad del suelo es difícil. Por este motivo, se usan generalmente fumigantes del suelo. Debido a su efecto limitado y desde el punto de vista de la contaminación medioambiental, sin embargo, se ha deseado el desarrollo de una técnica alternativa. Se ha encontrado que el uso de la composición que induce resistencia a enfermedades según la presente invención puede ser uno de los métodos de control de enfermedades del suelo utilizando la acción inductora de resistencia de los cultivos.

Tabla 6

	Parcela experimental E	Parcela comparativa H	Parcela control
Valor protector	79	70	0

Ejemplo 8: Prueba de control del marchitamiento por *Fusarium* en melón

(1) Método

Se sumergieron plantas de melón (variedad: Ams) (tercera o cuarta hoja desarrollada (hoja verdadera)) en cada líquido de prueba durante 10 h. Después de eso, se inocularon conidios del hongo del brazo muerto del melón (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* raza 2) cultivadas en un medio de dextrosa de patata mediante empapado. Se trató la parcela experimental (E) con un líquido (concentración: 20 ppm en cuanto a cerebrósido B) preparado diluyendo concentrado de extracto etanólico A preparado en el ejemplo 1 150 veces. Se trató la parcela de comparación (H) con un líquido que tenía una concentración de cerebrósido B de 20 ppm.

(2) Resultados

Se investigó el porcentaje de desarrollo de enfermedad de raíces 21 días tras la inoculación, y se calculó el valor protector del porcentaje de desarrollo de enfermedad promedio de raíces. Se muestran los resultados en la tabla 7. El valor protector era de 63 para la parcela de tratamiento con concentrado de extracto etanólico A (E) y de 52 para la parcela de tratamiento con cerebrósido B (H). Por tanto, pudo confirmarse que la composición que induce resistencia a enfermedades según la presente invención es muy eficaz para el control de enfermedades en vegetales. Este efecto se considera atribuible al hecho de que la transferencia de penetración del cerebrósido como componente activo en el cuerpo de la planta puede potenciarse mediante el efecto de extensión de la sustancia

liposoluble contenida en la composición que induce resistencia a enfermedades de la presente invención tras la aplicación.

5 Se considera que esto se logra potenciando el efecto de extensión de la sustancia liposoluble contenida en la composición que induce resistencia a enfermedades de la presente invención tras la aplicación y la transferencia de penetración del cerebrósido como componente activo en el cuerpo de la planta.

10 Aunque no hay intención de restringirse a la siguiente teoría, se cree que, aunque la estructura del cerebrósido es inestable en una disolución acuosa, el cerebrósido, junto con la sustancia liposoluble contenida en la composición de la presente invención, forma una estructura de orden superior estable que también es relativamente estable en el cuerpo de la planta y se transfiere y difunde gradualmente en el cuerpo de la planta. Esta penetración conduce a la expectativa de un efecto de control más estable y un efecto residual más prolongado en virtud de una baja susceptibilidad a la eliminación por flujo de la superficie de hojas por la lluvia, menos susceptibilidad a la fotodegradación por la luz solar y falta de dependencia significativa del efecto de control de la cantidad del líquido químico que va a aplicarse.

Tabla 7

	Parcela experimental E	Parcela comparativa H	Parcela control
Valor protector	63	52	0

15 Ejemplo 9:

Se extrajo el cuerpo fructífero secado por congelación de cada uno de seta Shiitake (*Lentinus edodes*), gallina de los bosques (*Grifola frondosa*) y champiñón ostra (*Pleurotus ostreatus*) con acetato de etilo como disolvente. Por separado, se cultivaron hongos que pertenecían al género *Aspergillus* (*Aspergillus niger*), hongos que pertenecían al género *Penicillium* (*Penicillium roquefortii*), hongos que pertenecían al género *Mucor* (*Mucor prainii*) y hongos que pertenecían al género *Rhizopus* (*Rhizopus delemar*) en un medio líquido que contenía almidón de maíz al 1%, melaza al 1% y licor de maíz al 1% (pH 5,5 ajustado mediante la adición de una disolución de hidróxido de potasio acuosa). Se centrifugó el cultivo a 6.000 x g durante 20 min. para recoger micelios, seguido por extracción con disolvente con acetato de etilo en una cantidad de 10 veces (p/v) el peso de micelios sin tratar. Se sometió el extracto de disolvente a la etapa de concentración/separación como en el ejemplo 1 para reducir el volumen del extracto a un décimo del volumen original. Por tanto, se separaron sustancias fisiológicamente inhibitoras, y se concentraron sustancias inductoras de resistencia a enfermedades de plantas para preparar una composición que induce resistencia a enfermedades de plantas.

Se midió el contenido de cerebrósido B en la composición mediante el método de HPLC anterior para calcular el contenido en cerebrósido B por peso del material de partida. Además, se diluyó cada uno de los extractos de disolvente así obtenidos con agua hasta una concentración de 100 ppm en cuanto a cerebrósido B, y se aplicaron entonces las disoluciones diluidas a las briznas de plantas de arroz. Se midió la actividad estimulante 7 días tras la aplicación de las disoluciones diluidas usando, como índice, la cantidad de fitoalexinas inducida en la estructura de la hoja mediante el método descrito en el documento WO 98/47364. Se muestran los resultados en la tabla 8. Se expresó la cantidad de fitoalexinas en cuanto a la cantidad total de fitocasanos A, B, C y D y momilactonas A y B.

35 Tal como resulta evidente a partir de los resultados, puede extraerse eficazmente cerebrósido B particularmente a partir de basidiomicetos. Además, pudo confirmarse que las composiciones preparadas mediante extracción a partir de hongos filamentosos individuales tienen una capacidad inductora de fitoalexinas.

Tabla 8

	Seta Shiitake	Gallina de los bosques	Champiñón ostra	<i>A. niger</i>	<i>P. roquefortii</i>	<i>M. prainii</i>	<i>R. delemar</i>
Contenido en cerebrósido B de la composición, mg/ml	2,75	2,48	2,38	0,48	0,49	0,52	0,51
Contenido en cerebrósido B del producto con volumen reducido, mg/g de peso	0,23	0,21	0,20	0,04	0,04	0,05	0,05

Contenido en fitoalexina inducida, mg/g de hojas sin procesar	8,6	8,5	8,4	8,3	8,4	8,2	8,4
Contenido en sustancia liposoluble, mg/ml	100	98	95	28	30	33	32

Ejemplo 10: Prueba de control de la podredumbre de la raíz de la lechuga

(1) Método

Se trataron químicamente plantas de lechuga (variedad: Patriot) (tercera hoja desarrollada (hoja verdadera)) 12 h antes de la inoculación y se trasplantaron entonces a suelo contaminado con hongo de la podredumbre de la raíz de la lechuga (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raza SB1-1) (densidad de células: 3×10^4 UFC/g tal como se midió mediante un método de placa de dilución) para la inoculación de la infección. Se trataron parcelas experimentales con una disolución (E) preparada diluyendo concentrado de extracto etanólico A preparado en el ejemplo 1 300 veces (concentración: 10 ppm en cuanto a cerebrósido B) mediante tratamiento por inmersión, tratamiento por aplicación y tratamiento por riego, y se trataron con una disolución de cerebrósido B de 20 ppm (H) mediante tratamiento por inmersión. Se compararon los efectos logrados mediante estos tratamientos.

(2) Resultados

En el día 28 tras el trasplante, se investigó el desarrollo de la enfermedad utilizando síntomas internos. Se juzgó el grado de desarrollo de la enfermedad en cuanto a un índice basado en el nivel de desarrollo de la enfermedad. Se evaluó el nivel de desarrollo de la enfermedad según los siguientes criterios. 0: sin haz fibrovascular con el color alterado; 1: menos de un tercio del haz fibrovascular con el color alterado; 2: de un tercio a dos tercios del haz fibrovascular con el color alterado; y 3: no menos de dos tercios del haz fibrovascular con el color alterado. Se calculó el valor protector mediante la ecuación: valor protector = (grado promedio de desarrollo de la enfermedad de parcela control - grado promedio de desarrollo de la enfermedad de parcela experimental)/(grado promedio de desarrollo de la enfermedad de parcela control) x 100. Se muestran los resultados en la tabla 9. También se midió el peso de la parte aérea como producto (un producto agrícola). Como resultado, en el caso del tratamiento con concentrado de extracto etanólico (E), el valor protector era de 100 para la parcela de tratamiento por inmersión, de 72 para la parcela de tratamiento por aplicación y era de 86 para la parcela de tratamiento por riego. Para la parte aérea de la lechuga sin tratar, cuando se supuso que el peso en la parcela control era de 100, el peso era de 693 para la parcela de tratamiento por inmersión, era de 266 para la parcela de tratamiento por aplicación y era de 559 para la parcela de tratamiento por riego. Por tanto, pudo confirmarse que la composición que induce resistencia a enfermedades según la presente invención puede mostrar un efecto de control sin limitación sobre ningún método de tratamiento aunque las condiciones de tratamiento óptimas varían dependiendo del tipo de cultivos y la enfermedad diana.

Tabla 9

	Tratamiento por inmersión (E)	Tratamiento por aplicación (E)	Tratamiento por riego (E)	Tratamiento por inmersión (H)	Parcela control
Valor protector	100	72	86	78	0
Razón de peso bruto de la parte aérea	693	266	559	231	100

Ejemplo 11: Prueba de control del marchitamiento por *Verticillium* en tomate

(1) Método

Se sumergieron plantas de tomate (variedad: Hausumomotaro) (segunda hoja (hoja verdadera) expandida) en una disolución (E) preparada diluyendo concentrado de extracto etanólico A preparado en el ejemplo 1 150 veces. Tras el tratamiento por inmersión, se trasplantaron las plantas de tomate a suelo contaminado con hongo del marchitamiento por *Verticillium* del tomate (*Verticillium dahliae*) (densidad de células: 5×10^4 UFC/g) para la inoculación de la infección. Se trató la parcela experimental E con una disolución preparada diluyendo concentrado de extracto etanólico A 150 veces (concentración: 20 ppm en cuanto a cerebrósido B) durante 3, 6, 12 y 24 h. Se trató la parcela experimental H con una disolución de cerebrósido B de 20 ppm durante 12 h. Se determinaron y

compararon los efectos de control logrados mediante estos tratamientos.

(2) Resultados

5 En el día 21 tras el trasplante, se examinó el efecto de control mediante investigación del desarrollo de la enfermedad en cuanto a un índice basado en el síntoma externo. Se evaluó el grado de desarrollo de la enfermedad basado en el síntoma externo según los siguientes criterios. 0: hojas sanas; 1: síntoma externo observado en la hoja ubicada en la posición más baja o la segunda más baja; 2: síntoma externo observado en sustancialmente la mitad de las hojas; 3: síntoma externo observado en la mayoría de las hojas y también se observó caída de hojas; y 4: raíces marchitas. Se calculó el valor protector mediante la ecuación: valor protector = (grado promedio de desarrollo de la enfermedad de parcela control - grado promedio de desarrollo de la enfermedad de parcela experimental)/(grado promedio de desarrollo de la enfermedad de parcela control) x 100. Se muestran los resultados en la tabla 10. Tal como resulta evidente a partir de la tabla 10, en el caso del tratamiento (E) con el concentrado de extracto etanólico, cuando el tiempo de tratamiento era de 3 h, el valor protector era 12, es decir, el efecto de control era insatisfactorio. Por otro lado, cuando el tiempo de tratamiento era de 6 h o más largo, el valor protector era de aproximadamente 60, indicando que, en comparación con la parcela de comparación, se mostraba una actividad de control de la enfermedad definida. Se cree que el motivo por el que el efecto varía dependiendo del tiempo de tratamiento reside en que, puesto que el efecto de control de la composición de control de enfermedades según la presente invención es uno proporcionado mediante inducción de resistencia, se requiere un periodo de tiempo determinado para establecer la resistencia sobre el lado de la planta. Además, el hecho de que el valor protector en la parcela (H), que se había tratado con la disolución de cerebrósido B de 20 ppm durante 12 h, era de 60, muestra que la sustancia liposoluble contenida en la composición de control de enfermedades según la presente invención puede potenciar la actividad de control de enfermedades del cerebrósido independientemente de la especie de plantas.

Tabla 10

	3 h (E)	6 h (E)	12 h (E)	24 h (E)	12 h (E)	Parcela control
Valor protector	12	56	68	64	60	0

REIVINDICACIONES

1. Un método para inducir resistencia a enfermedades en una planta diana, que comprende la etapa de tratar la planta diana con una composición que comprende un glicoesfingolípido y una sustancia liposoluble obtenible mediante una etapa en la que se extraen junto con un disolvente orgánico que es acetato de etilo del hongo filamentoso, y luego concentrar el extracto obtenido mediante la extracción con el disolvente orgánico del hongo filamentoso y luego precipitar y eliminar sustancias que tienen actividad fisiológicamente inhibidora contra plantas,

5

en el que dicho hongo filamentoso es un microorganismo que pertenece a basidiomicetos o un microorganismo para producción por fermentación que pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en género *Aspergillus*, género *Penicillium*, género *Trichoderma*, género *Acremonium*, género *Mucor* y género *Rhizopus*, y

10

en el que dicho glicoesfingolípido es un cerebrósido que es uno cualquiera de cerebrósido A, cerebrósido B, cerebrósido C y cerebrósido D o una mezcla de los mismos.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho esfingolípido comprende cerebrósido B.
- 15 3. El método según la reivindicación 2, en el que el contenido de cerebrósido B es de 0,4 a 3,0 mg/ml y el contenido de la sustancia liposoluble es de 10 a 200 mg/ml en cuanto a un extracto de n-hexano.
4. El método según la reivindicación 2, en el que el contenido de cerebrósido B es de 0,9 a 3,0 mg/ml y el contenido de la sustancia liposoluble es de 30 a 100 mg/ml en cuanto a un extracto de n-hexano.
- 20 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho microorganismo que pertenece a basidiomicetos es un microorganismo que pertenece a basidiomicetos comestibles o un microorganismo que pertenece a basidiomicetos de uso médico.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho microorganismo para producción por fermentación es uno para la producción de enzima, la producción de antibióticos y la producción de sacáridos.
- 25 7. El método según la reivindicación 5, en el que el microorganismo que pertenece a los basidiomicetos comestibles pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en género *Pleurotus*, género *Lentinus*, género *Flammulina*, género *Grifola*, género *Agaricus*, género *Auricularia*, género *Trametales*, género *Pholiota* y género *Sparassidaceae*.
- 30 8. El método según la reivindicación 5, en el que dicho microorganismo que pertenece a los basidiomicetos de uso médico es un microorganismo que pertenece al género *Wolfiporia* o género *Ganoderma*.
9. El método según la reivindicación 5, en el que dicho microorganismo que pertenece a los basidiomicetos se selecciona del grupo que consiste en *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus campestris* y *Auricularia polytricha*.
- 35 10. El método según la reivindicación 6, en el que dicho microorganismo para producción por fermentación se selecciona del grupo que consiste en *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium roquefortii*, *Mucor prainii* y *Rhizopus delemar*.