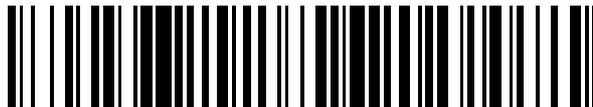


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 472**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2005 E 05762739 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 1771576**

54 Título: **Principios activos para el aumento de la defensa contra patógenos en plantas y procedimientos para su detección**

30 Prioridad:

20.07.2004 DE 102004035137

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

29.01.2014

73 Titular/es:

**BAYER CROPSCIENCE AG (100.0%)
ALFRED-NOBEL-STRASSE 50
40789 MONHEIM, DE**

72 Inventor/es:

**BARTSCH, KLAUS y
SCHULZ, ARNO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 440 472 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

Principios activos para el aumento de la defensa contra patógenos en plantas y procedimientos para su detección

Se describen un procedimiento para la detección de compuestos que inducen la defensa contra patógenos de plantas, en el que se observa como índice para la inducción el aumento de la expresión de genes endógenos de plantas individuales o varios del grupo de la biosíntesis de ácido jasmónico, de inhibidores de proteinasa vegetales, de inhibidores de xilanasas vegetales, de proteínas PR vegetales (proteínas relacionadas con patógenos) y de quitinasas vegetales, así como el uso de estos compuestos solos o en combinación con compuestos ya conocidos eficaces específica y directamente contra fitopatógenos, en el que la aplicación puede realizarse o bien simultáneamente o de manera temporalmente desplazada.

Los procedimientos y usos de la invención se dan a conocer en las reivindicaciones adjuntas.

Se sabe que las plantas reaccionan ante condiciones de estrés naturales, tales como por ejemplo frío, calor, sequedad, lesión, infestación con patógenos (virus, bacterias, hongos, insectos) etc. sin embargo también ante herbicidas con mecanismos de defensa específicos o inespecíficos [Pflanzenbiochemie, páginas 393-462, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlín, Oxford, Hans W. Heldt, 1996.; Biochemistry and Molecular Biology of Plants, páginas 1102-1203, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, eds. Buchanan, Gruissem, Jones, 2000]. A este respecto, los componentes de la pared celular que se producen por ejemplo mediante lesión o las sustancias de señal específicas procedentes del patógeno sirven como inductores de cadenas de transducción de señales vegetales que conducen al final a la formación de moléculas de defensa dirigidas contra el factor de estrés. Según esto puede tratarse por ejemplo de (a) sustancias de bajo peso molecular, tales como por ejemplo fitoalexinas, (b) proteínas no enzimáticas, tales como por ejemplo "proteínas relacionadas con patógenos" (proteínas PR), (c) proteínas enzimáticas, tales como por ejemplo quitinasas, glucanasas, o (d) de inhibidores específicos de proteínas esenciales, tales como por ejemplo de inhibidores de proteasa, inhibidores de xilanasas, que atacan directamente al patógeno o dificultan su proliferación (Dangl and Jones, 2001, Nature 411: 826-833; Kessler and Baldwin, 2003, Annual Review of Plant Biology, 53: 299-328).

Un mecanismo de defensa adicional es la denominada reacción de hipersensibilidad (HR), que se media por el estrés oxidativo y conduce a la muerte del tejido vegetal en la zona de un foco de infección, de manera que se impide una propagación de patógenos de plantas que están dirigidos a células vivas [Pennazio, 1995, New Microbiol. 18, páginas 229-240].

En el desarrollo posterior de una infección se retransmiten mediante neurotransmisores propios de plantas señales a tejido no infestado que conducen también allí al desencadenamiento de reacciones de defensa e impiden la producción de infecciones secundarias (Systemic acquired resistance, SAR) [Ryals *et al.*, 1996, The Plant Cell 8: 1809-1819].

Se conoce ya una serie de sustancias señal endógenas de plantas que están implicadas en la tolerancia al estrés o en la defensa contra patógenos. Pueden mencionarse en el presente documento por ejemplo ácido salicílico, ácido benzoico, ácido jasmónico o etileno [Biochemistry and Molecular Biology of Plants, páginas 850-929, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, eds. Buchanan, Gruissem, Jones, 2000]. Algunas de estas sustancias o sus derivados sintéticos estables y estructuras derivadas son eficaces también en aplicación externa sobre plantas o tratamiento de semillas y activan reacciones de defensa que tienen como consecuencia una elevada tolerancia al estrés o a patógenos de la planta [Sembdner, and Parthier, 1993, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44: 569-589]. La defensa mediada por salicilato se dirige especialmente contra hongos, bacterias y virus fitopatógenos [Ryals *et al.*, 1996, The Plant Cell 8: 1809-1819].

Un producto sintético conocido que adopta una función comparable al ácido salicílico y puede mediar una acción protectora frente a hongos, bacterias y virus fitopatógenos es benzotiadiazol (nombre comercial Bion®) [Achuo *et al.*, 2004, Plant Pathology 53 (1): 65-72].

Otros compuestos que pertenecen al grupo de las oxilipinas, tales como por ejemplo ácido jasmónico, y los mecanismos de protección desencadenados por los mismos son especialmente eficaces contra insectos dañinos [Walling, 2000, J Plant Growth Regul. 19, 195-216].

El documento WO 98/00023 da a conocer un procedimiento de selección para la detección de sustancias que por medio de la activación de la biosíntesis de ácido jasmónico protege las plantas frente a patógenos.

Por consiguiente se sabe que las plantas disponen de varios mecanismos de reacción endógenos que pueden provocar una defensa eficaz frente a los más diversos organismos dañinos y/o estrés abiótico natural. Sin embargo no se conocía hasta ahora un pronóstico sobre qué reacciones de defensa pueden producirse de manera dirigida mediante el uso de principios activos.

Por consiguiente existe una necesidad de un procedimiento para la detección dirigida de activadores moleculares de mecanismos de defensa endógenos de plantas frente a organismos dañinos y/o estrés abiótico natural (tal como por ejemplo calor, frío, sequedad, salinidad, así como carga de ácidos/y bases), de manera que puedan detectarse

principios activos novedosos, puedan identificarse nuevas propiedades de principios activos conocidos, sin embargo que actúan de distinto modo, o puedan optimizarse moléculas sin embargo ya conocidas o estructuras de control en el uso como inductores de los mecanismos de defensa endógenos de plantas.

Definiciones de términos usados a continuación

5 El término “análisis Blast” (Blast = *Basic Local Alignment Search Tool*), tal como se usa en el presente documento, describe el uso de programas informáticos adecuados para la clasificación y para la detección de secuencias potencialmente homólogas (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 1990, 215: 403-410), realizándose una comparación (alineación) entre una secuencia de búsqueda (*query sequence*) y todas las secuencias de uno o varios bancos de datos con la especificación de una coincidencia deseada en forma de un “criterio de significancia” (*scoring function*)
10 (R. Rauhut, Bioinformatik, páginas 38-107, Verlag Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001).

El término “ADNc” (ADN complementario), tal como se usa en el presente documento, describe una cadena sencilla de ADN, que es complementario a un ARN y que se sintetiza *in vitro* mediante una transcripción inversa enzimática. El ADNc puede corresponder o bien a toda la longitud de ARN o sin embargo representa únicamente una secuencia parcial del ARN que sirve como matriz.

15 El término “análisis *cluster*”, tal como se usa en el presente documento, significa la agrupación de los datos individuales determinados por medio de un programa informático desarrollado para ello, representándose de manera agrupada grupos de genes que codifican para proteínas con función similar, o sin embargo genes con patrón de expresión similar. Mediante esto se consigue una minimización jerárquica del patrón de datos complejo que puede representarse en forma de un dendograma. El análisis *cluster* permite la evaluación clasificatoria de los conjuntos de
20 datos obtenidos que supera claramente la mera acumulación de datos sin relación.

Con los términos “chip de ADN”, “matriz de ADN” y “micromatriz de ADN”, que en el presente documento se usan de manera sinónima, se designa un soporte cuyo material base está compuesto por ejemplo de vidrio o nailon, en cuyo material base están fijados fragmentos de ADN, pudiéndose realizar la aplicación del ADN por ejemplo mediante (a) un procedimiento fotolitográfico (se sintetiza ADN directamente en el soporte de matriz), (b) un procedimiento de microaplicación (se aplican oligonucleótidos sintetizados externamente o productos de PCR sobre el soporte y se unen covalentemente), o (c) mediante un procedimiento de micropulverización (se pulverizan oligonucleótidos sintetizados externamente o productos de PCR con un impresor por chorro de tinta sin contacto sobre el soporte) (R. Rauhut, Bioinformatik, páginas 197-199, Verlag Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001). Un chip de ADN que representa secuencias genómicas de un organismo se designa como “chip de ADN genómico”. La evaluación de los
25 valores de medición obtenidos con ayuda de estos “chips de ADN” se designa como “análisis de chip de ADN”.

El término “hibridación de chip de ADN”, tal como se usa en el presente documento, significa el apareamiento de dos moléculas de ácido nucleico complementarias monocatenarias, estando localizado uno de los componentes de molécula de apareamiento de bases como ADN (ácido desoxirribonucleico) sobre el chip de ADN en forma preferentemente unida covalentemente, mientras que el otro se encuentra en forma del ARN (ácido ribonucleico) o el
35 ADNc correspondiente a esto (ADN complementario) en disolución. La hibridación de los ácidos nucleicos unidos y no unidos se realiza sobre el chip de ADN en disolución tampón acuosa, eventualmente en condiciones adicionalmente desnaturizantes, tales como por ejemplo en presencia de dimetilsulfóxido, a temperaturas de 30-60 °C, preferentemente 40-50 °C, de manera especialmente preferente a 45 °C durante 10-20 horas, preferentemente durante 14-18 horas, de manera especialmente preferente durante 16 horas con movimiento constante. Las
40 condiciones de hibridación pueden realizarse constantemente por ejemplo en un horno de hibridación. Por defecto en un horno de hibridación de este tipo se realizan movimientos de 60 rpm (*rounds per minute*, revoluciones por minuto).

La secuencia de ácido nucleico designada con el término “secuencia EST” (*Expressed Sequence Tag*), tal como se usa en el presente documento, significa una secuencia corta de 200-500 bases o pares de bases.

45 Los términos usados de manera sinónima “patrón de expresión”, “patrón de inducción” o “perfil de expresión”, tal como se usa en el presente documento, describen la expresión temporalmente diferenciada y/o específica de tejido del ARNm vegetal, obteniéndose el patrón directamente mediante la intensidad generada de la señal de hibridación del ARN obtenido de la planta o su correspondiente ADNc con ayuda de la tecnología de chip de ADN. Los “valores de expresión” medidos resultan mediante cálculo directo con las correspondientes señales que se obtienen usando
50 un chip sinónimo con hibridación con una planta control no tratada.

El término “estado de expresión” que se obtiene mediante el “perfil de expresión génico” realizado, tal como se usa en el presente documento, describe toda la actividad de transcripción registrada de genes celulares que se mide con ayuda de un chip de ADN.

55 El término “ARN total”, tal como se usa en el presente documento, describe la posible representación debido al procedimiento de disgregación usado de distintos grupos de ARN endógenos de plantas que pueden encontrarse en una célula vegetal, tal como por ejemplo, ARNr citoplasmático (ARN ribosómico), ARNt citoplasmático (ARN de transferencia), ARNm citoplasmático (ARN mensajero), así como sus respectivos precursores nucleares, ARNct (ARN cloroplastídico) y ARNmt (ARN mitocondrial), sin embargo comprende también moléculas de ARN que pueden

proceder de organismos exógenos, tal como por ejemplo de virus, o bacterias parasitarias y hongos.

El término "plantas útiles", tal como se usa en el presente documento, designa plantas de cultivo que se usan como plantas para la obtención de alimentos, piensos o para fines técnicos.

5 El término "protector selectivo", tal como se usa en el presente documento, designa un compuesto químico que no es de origen endógeno de planta y que anula o reduce las propiedades fitotóxicas de un pesticida contra plantas útiles, sin que la acción pesticida contra organismos dañinos, tal como por ejemplo malas hierbas, bacterias, virus y hongos se reduce esencialmente.

10 Es objeto de la presente descripción de la invención un procedimiento para la detección de un compuesto que induce la defensa contra patógenos de plantas, en el que se evalúa como índice para la inducción el aumento de la transcripción o la expresión de genes endógenos de plantas individuales o varios del grupo de la biosíntesis de ácido jasmónico, de inhibidores de proteinasa vegetales, de inhibidores de xilanasa vegetales, de proteínas PR vegetales (proteínas relacionadas con patógenos) y de quitinasas vegetales.

15 Es objeto de la presente descripción de la invención especialmente un procedimiento para la detección de compuestos que inducen la transcripción de los genes que codifican para enzimas endógenas de plantas de la defensa contra patógenos, caracterizado porque:

- a) se llevan a contacto plantas de prueba con una cantidad adecuada de la sustancia de prueba o las sustancias de prueba,
- b) no se llevan a contacto plantas control, en condiciones por lo demás iguales que las plantas de prueba en a), con la o las sustancias de prueba,
- 20 c) se extrae ARN de las plantas de prueba y control,
- d) el ARN se marca o bien directamente de manera radiactiva o de manera no radiactiva, o sin embargo el ARN se marca con transcripción enzimática simultánea en el correspondiente ADNc de manera radiactiva o de manera no radiactiva, o sin embargo se transcribe el ADNc obtenido, no marcado enzimáticamente en un correspondiente ARNc marcado de manera radiactiva o de manera no radiactiva,
- 25 e) se hibrida una matriz de ADN que contiene secuencias de ADN vegetal con las sustancias obtenidas de acuerdo con la etapa d),
- f) se preparan perfiles de expresión de los genes para la expresión de la biosíntesis de ácido jasmónico, de inhibidores de proteinasa vegetales, de inhibidores de xilanasa vegetales, de proteínas PR vegetales (proteínas relacionadas con patógenos) y/o de quitinasas vegetales de manera comparativa para las plantas sometidas a prueba de acuerdo con a) y b).
- 30 g) se realiza una cuantificación de las diferencias de expresión medidas de acuerdo con f),
- h) se realiza una sistematización final de los perfiles de expresión asignados de acuerdo con g) mediante análisis *cluster*.

35 En el caso de la etapa mencionada anteriormente d), la transcripción enzimática del ADNc obtenido en un ARNc puede considerarse como etapa de procedimiento preferente, dado que mediante esto puede conseguirse una amplificación retirada de la sonda de hibridación. Igualmente se prefiere la marcación por medio de nucleótidos no radiactivos, de manera especialmente preferente la marcación por medio de UTP y/o CTP biotinilado, realizándose la detección a continuación de la reacción de hibridación realizada mediante la unión de estreptavidina-ficoeritrina como fluoróforo y el ARNc biotinilado. Una detección de la fluorescencia de ficoeritrina específica, que sirve como base para la cuantificación de las diferencias de expresión medidas, se realiza a continuación de la hibridación con ayuda de un escáner con láser.

40 Es objeto preferente de la presente descripción de la invención un procedimiento manteniendo los desarrollos de procedimiento mencionados anteriormente a)-h), en el que

- 45 (i) el perfil de expresión de un gen de la proteína de tipo lipasa, de la 12-oxofitodienoato reductasa (EC 1.3.1.42), de la aleno-óxido ciclasa, de la ácido 12-oxofitodienoico reductasa, y/o
- (ii) el perfil de expresión de un gen de un inhibidor de proteinasa vegetal, que presenta homologías significativas con respecto al inhibidor de proteinasa con la entrada en el banco de datos de proteínas PIR S71555, y/o
- (iii) el perfil de expresión de un gen de una proteína de inhibidor de xilanasa vegetal y/o
- 50 (iv) el perfil de expresión de un gen de la peroxidasa inducida por patógenos vegetal (EC 1.11.1.7), una proteína, que presenta homologías significativas con respecto a la proteína relacionada con patógeno (PR) del banco de datos de proteínas PIR con el número T06168 de cebada y/o
- (v) el perfil de expresión de un gen de la quitinasa vegetal

55 se eleva en comparación con una planta control no tratada por ejemplo en el factor 2 o más, preferentemente en el factor 2-100, preferentemente 2-20, de manera especialmente preferente 2-10, de manera muy especialmente preferente 2-5, pudiéndose encontrar el aumento de los perfiles de expresión modificados de los genes individuales independientemente entre sí en los distintos intervalos de magnitud mencionados anteriormente.

Es además objeto de la presente descripción de la invención el uso de determinadas micromatrices de ADN que se usan a base de información genética de plantas, preferentemente de información genética de plantas útiles, de

manera especialmente preferente de plantas útiles tales como por ejemplo de cebada, maíz, trigo, arroz, avena, colza, remolacha azucarera de la detección de patrones de expresión génica modificados. A este respecto se consideran las modificaciones relativas de los patrones génicos para genes de la biosíntesis de ácido jasmónico, de inhibidores de proteinasa vegetales, de inhibidores de xilanas vegetales, de proteínas PR vegetales (proteínas relacionadas con patógenos) y/o de quitinasas vegetales en plantas tratadas con los compuestos que van a someterse a prueba en comparación con plantas control no tratadas.

Otro objeto de la presente descripción de la invención es también el uso de los compuestos que se identificaron con el procedimiento mencionado anteriormente de manera positiva, es decir que aumenta la expresión con respecto a su acción inductiva sobre genes de la biosíntesis de ácido jasmónico, de inhibidores de proteinasa vegetales, de proteínas PR vegetales (proteínas relacionadas con patógenos) y/o de quitinasas vegetales, como principios activos para el aumento de la tolerancia al estrés y/o de la defensa contra patógenos en plantas útiles.

Por tanto es objeto de la presente descripción de la invención el uso de compuestos que contribuyen en plantas, directa o indirectamente, tal como por ejemplo mediante una cadena de transducción de señales, al aumento de las defensas contra organismos fitopatógenos, tales como por ejemplo insectos, hongos, bacterias o virus, presentando al menos un gen, preferentemente varios genes que codifican para proteínas del grupo de las proteínas de la biosíntesis de ácido jasmónico, de inhibidores de proteinasa vegetales, de inhibidores de xilanas vegetales, de proteínas PR vegetales (proteínas relacionadas con patógenos) y/o de quitinasas vegetales, un perfil de expresión aumentado.

Según esto se prefieren aquellos compuestos que se conocen en su uso como los denominados protectores selectivos ya en la protección de plantas, tales como por ejemplo, mefenpir-dimetilo, mefenpir-dietilo, análogos de mefenpir, isoxadifeno-etilo, cloquintocet-mexilo, derivados de cloquintocet, así como piridincarboxamida.

En el uso de la invención se encuentra el compuesto isoxadifeno-etilo.

Mediante la aplicación de los compuestos mencionados anteriormente pueden protegerse plantas útiles de manera eficaz contra organismos fitopatógenos (insectos, hongos, bacterias, virus), lo que repercute por ejemplo también en rendimientos más altos. Es ventajoso con respecto a los principios activos que están dirigidos directamente contra estos organismos que se protegen insectos beneficiosos, dado que éstos no pueden desencadenar las correspondientes reacciones de defensa.

Por tanto es objeto de la presente descripción de la invención también un procedimiento para la protección de plantas útiles en cultivos de plantas útiles frente a organismos fitopatógenos, especialmente frente a insectos, hongos, bacterias y virus mediante la aplicación de los compuestos identificados con ayuda de la matriz de ADN con consideración de los perfiles de expresión de los genes de la biosíntesis de ácido jasmónico, de inhibidores de proteinasa vegetales, de inhibidores de xilanas vegetales, de proteínas PR vegetales (proteínas relacionadas con patógenos) y/o de quitinasas vegetales. Se prefiere muy especialmente la protección frente a organismos fitopatógenos y según esto especialmente frente a insectos, muy especialmente frente a insectos chupadores.

Los mecanismos mencionados desencadenados mediante los compuestos detectados con ayuda de las matrices de ADN, como también por ejemplo mediante compuestos conocidos ya como protectores selectivos conducen también a efectos sinérgicos entre estos compuestos y otros compuestos eficaces específicamente y directamente contra fitopatógenos, tales como por ejemplo insecticidas y fungicidas, especialmente en aplicación conjunta o temporalmente desplazada con insecticidas y fungicidas, sobre todo con insecticidas, tales como por ejemplo compuestos del grupo de los cetoenoles [por ejemplo en los documentos EP 528156; EP 596298] o agonistas o antagonistas del receptor de acetilcolina nicotinérgico. Los últimos compuestos se engloban en parte con el término nitrometilenos o nitroiminas y compuestos relacionados con éstos (por ejemplo en el documento EP 464830).

Por tanto es objeto de la presente descripción de la invención también el uso de los compuestos identificados mediante la selección por medio de una matriz de ADN considerando los perfiles de expresión de los genes de la biosíntesis de ácido jasmónico, de inhibidores de proteinasa vegetales, de inhibidores de xilanas vegetales, de proteínas PR vegetales (proteínas relacionadas con patógenos) y/o de quitinasas vegetales en combinación con compuestos ya conocidos, eficaces frente a fitopatógenos específicamente y directamente, tal como por ejemplo la combinación de derivados de mefenpir (tal como por ejemplo el compuesto mencionado en "The Pesticide Manual, 13ª edición, 2003" con el n.º 506) con insecticidas que actúan directamente sobre el organismo dañino, de manera especialmente preferente con un insecticida del grupo de los cetoenoles o del grupo de los nitrometilenos/nitroiminas, o el uso de derivados de isoxadifeno (tal como por ejemplo el compuesto mencionado en "The Pesticide Manual, 13ª edición, 2003" con el n.º 478) con insecticidas que actúan directamente sobre el organismo dañino, pudiéndose realizar la aplicación o bien simultáneamente o de manera temporalmente desplazada. En la aplicación que se realiza no simultáneamente puede aplicarse el insecticida que actúa directamente sobre el organismo dañino o bien antes o tras la aplicación del compuesto identificado por medio de la matriz de ADN descrita en el presente documento, prefiriéndose una aplicación posterior del insecticida que actúa directamente sobre el organismo dañino.

Los siguientes ejemplos describen la invención en detalle.

Ejemplo 1

Detección de la acción de protectores selectivos sobre mecanismos de defensa en plantas mediante perfil de expresión génica (GEP):

5 Se pusieron plantas de cebada (variedad Baronesse) en macetas con tierra (diámetro: 10 cm) durante 10 días en una cámara climática con condiciones definidas de luz, humedad y temperatura (luz blanca, 70 % de humedad del aire, 24 °C). En el momento de la aplicación por pulverización tenían las plántulas un tamaño de aproximadamente 15 cm. Como sustancias de prueba se seleccionaron en este ejemplo moléculas que se diferenciaban estructuralmente de manera clara, para las que se probó una acción fuerte de protector selectivo, así como otras moléculas con acción conocida por la bibliografía sobre la tolerancia de la planta al estrés y a patógenos (tabla 1).

10 Las sustancias se aplicaron como disoluciones madre en DMSO (dimetilsulfóxido) con c = 10 mg/ml. A partir de esto se prepararon diluciones en agua con un 0,2 % de agrotina (que contiene poli(alcohol vinílico), silicona, polisacáridos y reguladores de pH, fabricante Bayer CropScience AG, Monheim, Alemania) como humectante que corresponde a las cantidades de aplicación indicadas en la tabla. La cantidad de líquido de la aplicación por pulverización ascendía a 800 µl por maceta que corresponde a 800 l/ha. A 800 µl de caldo de pulverización se añadieron aún 16 µl de premezcla de EC : alcohol diacetónico = 1 : 6 como coadyuvante de formulación. Las sustancias mencionadas en la

15 tabla 1 se aplicaron por medio de una pistola de pulverización neumática sobre las hojas. Se pulverizaron respectivamente 2 dosis de sustancias y se realizaron todos los ensayos en replicas (2 macetas por sustancia). Como controles se realizaron pulverizaciones con formulación ciega sin principio activo. Tras 6 h se congelaron ultrarrápidamente las hojas recolectadas en nitrógeno líquido y se almacenaron hasta el tratamiento a -80 °C. La preparación de las sondas de ARN marcadas para la hibridación de chip de ADN se realizó según los protocolos (Expression Analysis, Technical Manual) de la empresa Affymetrix (Affymetrix Inc., 3380 Central Expressway, Santa Clara, CA, EE.UU.). De cada 500 mg de las hojas cosechadas se aisló en primer lugar ARN total. Cada 10 µg de ARN total se usaron para la síntesis de la primera y segunda cadena de ADNc. El ADNc se amplificó con T7-polimerasa y a este respecto se marco simultáneamente con biotina-UTP. Cada 20 µg de este

20 ADNc biotilado se usaron para la hibridación de la matriz de genoma de cebada (Gene Chip Barley1, n.º de pedido: 511012) de Affymetrix. Esta micromatriz de ADN contiene secuencias de ADN de 22840 genes que están compuestos en total de 400000 secuencias EST. A continuación se lavaron las micromatrices de ADN en la Fluidics Station de Affymetrix, se tiñeron con estreptavidina/ficoeritrina (Molecular Probes, P/N S-866) y se escanearon con el respectivo Agilent Laser Scanner (Agilent Gene Array Scanner). Los datos de fluorescencia obtenidos se analizaron con el software Microarray Suite 5 de Affymetrix. Tras realizar los controles de calidad se almacenaron todos los

30 análisis de chip de ADN en un banco de datos. Para la determinación de valores de expresión relativos para genes (factores de inducción, represión) se compararon los chips de prueba y control entre sí y se tomaron como base los criterios de significancia predeterminados en el software de Affymetrix. Las dos replicas biológicas de un experimento se compararon en cada caso con 2 chips de control (formulación ciega) y los en cada caso 4 valores de expresión obtenidos por gen se promediaron mediante cálculo de mediana. Estas medianas están indicadas como factores de inducción en las tablas de resultados. Se realizaron comparaciones semejantes de perfiles de expresión de distintos experimentos y análisis *cluster* con el software GeneMaths 1.5 de Applied Maths (Applied Maths, Keistraat 120, 9830 Sint-Martens-Latem, Bélgica).

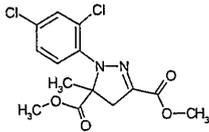
40 La combinación de grupos de genes de determinadas rutas metabólicas y cadenas de transducción de señales se realizó mediante búsqueda de palabra clave (Key Word) en las anotaciones de los genes proporcionadas por Affymetrix, así como análisis Blast (comparaciones de homología) de las secuencias diana de ADN, es decir de la secuencia identificada en el chip de ADN positiva (identificada mediante modificación del perfil de expresión), con secuencias génicas caracterizadas funcionalmente de otros organismos, preferentemente vegetales.

Tabla 1

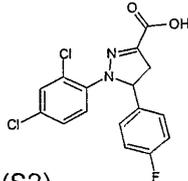
Sustancia de prueba (n.º):	Cantidad de aplicación [g a.i./ha]:	Propiedad conocida:
Mefenpir-dimetilo (1)	150	Protector selectivo
Análogo de mefenpir (2)	150	Protector selectivo
isoxadifeno-etilo (3)	150	Protector selectivo
Cloquintocet-mexilo (4)	150	Protector selectivo
Derivado de cloquintocet (5)	150	Protector selectivo
Piridincarboxamida (6)	150	Protector selectivo
Salicilhidroxamato (7)	500	Inductor de resistencia
Bion® (=acibenzolar-S-metilo) (8)	150	Inductor de resistencia

Sustancia de prueba (n.º):	Cantidad de aplicación [g a.i./ha]:	Propiedad conocida:
Ácido dicloroisonicotínico (9)	150	Inductor de resistencia
Ácido diclorosalicílico (10)	150	Inductor de resistencia

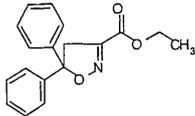
Fórmulas estructurales de las sustancias de prueba usadas de acuerdo con la tabla anterior 1:



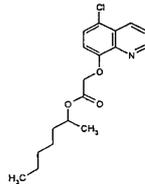
(S1)



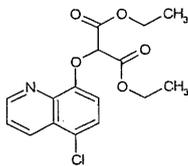
(S2)



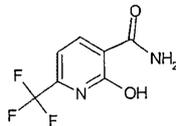
(S3)



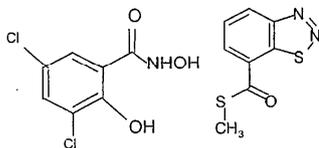
(S4)



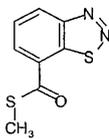
(S5)



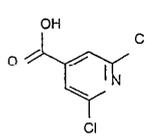
(S6)



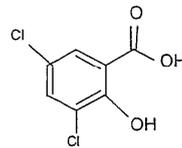
(S7)



(S8)



(S9)



(S10)

- 5 Una revisión de grupos de genes de cadenas de transducción de señales y rutas metabólicas, que están relacionadas con la tolerancia al estrés y la defensa contra patógenos, dio como resultado entre otras cosas un fuerte inducción de genes para inhibidores de proteasa y xilanasas y genes de la biosíntesis de ácido jasmónico (tabla 2a), así como genes para proteínas PR y quitinasas (tabla 2b), para un grupo de compuestos para los que se conoce hasta ahora una acción como protector selectivo (S1-S6).

ES 2 440 472 T3

Tabla 2a

Número de "conjunto de muestras"	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1.1 Contig2631_at	1,00	1,00	97,68	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1.2 HI02E21u_s_at	1,00	1,00	40,79	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,03	4,66
1.3 Contig3097_at	1,00	1,00	8,51	1,00	1,00	1,00	1,00	2,11	1,00	1,00
1.4 Contig5146_at	7,73	4,47	4,50	4,72	5,35	6,77	1,00	1,00	1,00	1,00
1.5 Contig4986_at	1,00	1,00	3,76	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1.6 HV_Ceb0020 D05r2_s_at	1,00	1,00	3,68	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1.7 Contig6194_a_at	12,91	4,14	3,25	2,17	2,81	3,16	1,00	1,00	1,00	1,00
1.8 Contig9556_at	1,00	1,00	3,03	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1.9 Contig15_a_at	0,35	1,00	2,97	1,00	0,46	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1.10 Contig1736_at	1,00	1,00	2,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1.11 Contig12574_at	0,50	1,00	2,81	1,00	1,00	1,00	1,00	2,11	1,00	1,00
1.12 Contig6611_at	1,00	1,00	2,41	1,00	1,00	1,00	2,31	3,61	2,00	2,38
1.13 Contig10030_at	1,00	1,00	2,25	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1.14 Contig2305_at	1,00	1,00	2,14	1,00	1,00	1,00	41,07	81,57	12,55	18,13
1.15 Contig1737_at	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1.16 Contig3096_s_at	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,06	2,68	1,00	1,00
1.17 Contig13413_at	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,17	1,00	1,00
1.18 Contig2326_s_at	2,31	1,00	1,00	2,45	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1.19 Contig2330_x_at	4,03	2,39	1,00	2,83	1,00	2,55	1,00	1,00	1,00	1,00
1.20 Contig2337_at	4,89	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
2.1 Contig2088_s_at	1,00	1,00	4,26	1,00	1,00	1,00	4,79	7,36	2,36	2,41
2.2 Contig34_s_at	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,50	3,68	1,00	2,08
2.3 Contig88_x_at	1,00	1,00	4,53	1,00	1,00	1,00	21,86	22,94	4,59	4,41
2.4 HD07M22r_s_at	6,32	1,00	2,71	1,00	7,84	5,10	1,00	1,00	1,00	1,00
3.1 Contig8905_at	3,10	2,53	2,99	2,73	3,01	2,45	1,00	1,00	2,53	1,00

Valores de expresión medidos (x veces sobre el valor del control no tratado) para:

- 5 (a) genes de la biosíntesis de ácido jasmónico vegetal (1.1 - 1.20)
- (b) genes que codifican para inhibidores de proteinasa vegetales (2.1 - 2.4)
- (c) gen que codifica para un inhibidor de xilanasa vegetal (3.1)

El número de "conjunto de muestras" corresponde a la respectiva posición del chip de ADN del chip de Affymetrix.

10 Al número de "conjunto de muestras" puede asignarse, con ayuda de un análisis Blast, la secuencia conocida correspondiente mejor posible de otros bancos de datos de secuencias anotados. Estos datos presentados de acuerdo con el análisis Blast se mencionan a continuación.

ES 2 440 472 T3

Número de "conjunto de muestras"	secuencia correspondiente con función anotada, de ADN generalmente accesible o banco de datos de proteínas
1.1	proteína de tipo lipasa (<i>Oryza sativa</i> ; grupo de cultivo japónica)
1.2	lipoxigenasa (EC 1.13.11.12) cebada gbAAB70865
1.3	aleno óxido sintasa (<i>Hordeum vulgare</i> subespecie <i>vulgare</i>)
1.4	probable 12-oxofitodienoato reductasa (EC 1.3.1.42)
1.5	aleno óxido ciclasa (<i>Oryza sativa</i> ; grupo de cultivo japónica)
1.6	aleno óxido ciclasa (<i>Oryza sativa</i> ; grupo de cultivo japónica)
1.7	ácido 12-oxofitodienoico reductasa (<i>Oryza sativa</i>)
1.8	12-oxofitodienoato reductasa 3 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
1.9	proteína de tipo lipasa/hidrolasa motivo GDSL, At5g55050.1
1.10	lipoxigenasa 1 pir T05941 (EC 1.13.11.12) cebada
1.11	supuesta lipoxigenasa (<i>Oryza sativa</i> , grupo de cultivo japónica)
1.12	similar a lipasas (<i>Arabidopsis thaliana</i> ; gb AAM20450.1
1.13	supuesto homólogo de lipasa (<i>Oryza sativa</i> ; grupo de cultivo japónica)
1.14	lipoxigenasa inducible por jasmonato de metilo gbAAC12951.1
1.15	probable lipoxigenasa gbAAB60715.1
1.16	aleno óxido sintasa (<i>Hordeum vulgare</i> subespecie <i>vulgare</i>)
1.17	similar a lipasas (<i>Arabidopsis thaliana</i> ; gb AAM20450.1)
1.18	ácido 12-oxofitodienoico reductasa (<i>Oryza sativa</i>)
1.19	ácido 12-oxofitodienoico reductasa (<i>Oryza sativa</i>)
1.20	12-oxofitodienoato reductasa (OPR1) At1g76680.1
2.1	inhibidor de tripsina tipo Bowman-Birk
2.2	supuesto inhibidor de proteinasa (<i>Hordeum vulgare</i> subespecie <i>vulgare</i>)
2.3	supuesto inhibidor de proteinasa (<i>Hordeum vulgare</i> subespecie <i>vulgare</i>)
2.4	inhibidor de proteinasa (pir S71555, cebada)
3.1	proteína inhibidora de xilanas (<i>Triticum aestivum</i>)

Tabla 2b

"Número de "conjunto de muestras"	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
4.1 Contig2118_at	8,69	1,00	4,86	1,00	2,33	2,20	1,00	1,00	1,00	1,00
4.2 Contig5369_at	2,35	1,00	4,76	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4.3 Contig5607_s_at	18,64	15,56	13,36	18,38	8,75	9,99	1,00	1,00	1,00	1,00
5.1 Contig2990_at	4,17	1,00	2,77	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,39	1,00
5.2 Contig2992_s_at	6,50	1,00	2,19	1,00	3,12	2,27	1,00	1,00	2,14	1,00
5.3 Contig5023_at	9,51	3,18	1,00	1,00	2,73	1,00	1,00	1,00	4,56	1,00

5 Valores de expresión medidos (x veces sobre el valor del control no tratado) para

- (a) genes que codifican para proteínas PR vegetales (4.1 - 4.3)
 (b) genes que codifican para quitinasas vegetales (5.1 - 5.3)

El número de “conjunto de muestras” corresponde a la respectiva posición del chip de ADN del chip de Affymetrix.

- 5 Al número de “conjunto de muestras” puede asignarse, con ayuda de un análisis Blast, la secuencia conocida correspondiente mejor posible de otros bancos de datos de secuencias anotados. Estos datos presentados de acuerdo con el análisis Blast se mencionan a continuación.

Número de “conjunto de muestras”	secuencia correspondiente con función anotada, de ADN generalmente accesible o banco de datos de proteínas
4.1	Peroxidasa (EC 1.11.1.7), inducida por patógenos (cebada)
4.2	proteína relacionada con patógenos; (<i>Oryza sativa</i> ; gbAAL74406.1)
4.3	proteína relacionada con patógenos (cebada; PirT06168)
5.1	quitinasa (EC 3.2.1.14) (cebada; embCAA55344.1)
5.2	quitinasa (EC 3.2.1.14) (cebada; embCAA55344.1)
5.3	quitinasa clase III (<i>Oryza sativa</i> subespecie japónica; gbAAM08773.1)

- 10 Los patrones de inducción derivados de estas tablas, que se representan directamente mediante los valores de expresión obtenidos, muestran diferencias características entre protectores selectivos e inductores de resistencia, acentuándose de la manera más intensa la acción sobre la biosíntesis de ácido jasmónico con isoxadifeno.

Los patrones de expresión encontrados permiten la detección de sustancias con firma similar y proponen el término a una acción similar de estas sustancias en la activación de la defensa de la planta contra patógenos.

Ejemplo 2

Acción repelente de plantas tratadas con protectores selectivos sobre insectos fitopatógenos:

- 15 Se pusieron plantas de cebada (variedad Baronesse) tal como se describe en el ejemplo 1 y tras 10 días se trataron con 150 g a.i./ha de isoxadifeno-etilo (S 3) o formulación ciega mediante aplicación por pulverización. Los ensayos se realizaron en replicas de en cada caso 10 macetas.

- 20 Todas las macetas se inocularon 6 h o 24 h tras la aplicación de sustancias con una población del pulgón fitopatógeno *Rhopalosiphum padi* de manera uniforme. Los ensayos se evaluaron tras 7 días y 14 días mediante recuento de los animales que se encuentran en las hojas.

Las poblaciones de pulgones se redujeron en las plantas tratadas con protectores selectivos en comparación con los controles tras 7 días en un 50 % de promedio y tras 14 días en un 70 % de promedio.

Una toxicidad directa de isoxadifeno-etilo (S3) contra pulgones no pudo detectarse en la prueba Sachez sin plantas.

- 25 **Ejemplo 3**

Detección de concentraciones elevadas de oxofitodienoato (OPDA) y jasmonato (JA) en plantas tratadas con isoxadifeno

Se pusieron plantas de cebada (variedad Baronesse) de acuerdo con las condiciones descritas en le ejemplo 1 y se trataron mediante aplicación por pulverización con protector selectivo isoxadifeno-etilo (S 3).

- 30 Las cantidades de aplicación se seleccionaron tal como sigue:

(1) 30 [g a.i./ha]; (2) 150 [g a.i./ha]; (3) formulación ciega (ningún principio activo)

Las hojas de plantas se recolectaron tras el tratamiento en distintos momentos (h= horas), y concretamente tras 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h y 48 h. Todas las muestras se pusieron respectivamente como replicas de 3 macetas.

- 35 El tratamiento de los octadecanoides y jasmonatos de las hojas se realizó según un procedimiento descrito en la bibliografía (Müller A, Düchting P y Weiler EW (2002), A multiplex GC-MS / MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. Planta, 216, 44-56).

Para cada punto de medición se extrajeron 300 mg de material de planta.

Para la normalización interna se usaron 50 pmol de [¹³C]2-JA y 100 pmol de [17,17,17,18,18-²H]-cis-OPDA. La purificación de los extractos se realizó por medio de cromatografía de intercambio aniónico de aminopropilo en columnas de intercambio de fase sólida en miniatura aún fabricadas.

- 5 Los resultados están representados en las tablas 3a a 3d, representando los valores indicados respectivamente valores promedio de las 3 replicas.

Tabla 3a

Concentración de oxofitodienoato (OPDA) medida en pmol/g de tejido de hoja

Tiempo / Horas	Control	Isoxadifeno-etilo (S3) 30 g a.i./ha
0	2500	2500
1	1500	6500
2	1000	3750
4	2500	7000
6	2500	9000

Tabelle 3b

- 10 Concentración de oxofitodienoato (OPDA) medida en pmol/g de tejido de hoja

Tiempo / horas	Control	Isoxadifen-etilo (S3) 150 g a.i./ha
0	2600	2600
1	1600	2800
2	1200	1800
4	2600	2200
6	2700	5100
12	3600	2400
24	2800	5100
48	1800	1900

Tabla 3c

Concentración de jasmonato (JA) medida en pmol/g de tejido de hoja

Tiempo / horas	Control	Isoxadifen-etilo (S3) 30 g a.i./ha
0	140	140
1	180	600
2	70	320
4	190	790
6	130	620

Tabla 3d

Concentración de jasmonato (JA) medida en pmol/g de tejido de hoja

Tiempo / horas	Control	Isoxadifen-etilo (S3) 150 g a.i./ha
0	140	140

ES 2 440 472 T3

(continuación)

Tiempo / horas	Control	Isoxadifen-etilo (S3) 150 g a.i./ha
1	175	290
2	70	280
4	190	270
6	135	275
12	220	155
24	145	265
48	135	320

5 Las concentraciones de oxofitodienoato (OPDA) se encontraban en el intervalo de 1800-9000 pmol/g de tejido de hoja, en caso del jasmonato (JA) en el intervalo de 70-800 pmol/g de tejido de hoja. Tras el tratamiento con isoxadifeno-etilo (S 3) pudo medirse un aumento claro de las concentraciones de ambas sustancias hasta aproximadamente 5 veces los valores en las muestras de formulación ciega sin principio activo.

REIVINDICACIONES

1. Uso de isoxadifeno-etilo para la protección de plantas útiles en cultivos de plantas útiles frente a insectos fitopatógenos.
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que isoxadifeno-etilo se usa en cultivos de plantas útiles en combinación con compuestos eficaces directamente contra insectos fitopatógenos, y en el que la aplicación se realiza o bien simultáneamente o de manera temporalmente desplazada.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que con los compuestos eficaces directamente contra insectos fitopatógenos se trata de compuestos del grupo de los cetoenoles o de agonistas o antagonistas del receptor de acetilcolina nicotinérgico.
- 10 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los agonistas o antagonistas del receptor de acetilcolina nicotinérgico se seleccionan del grupo de los nitrometilenos y nitroiminas.