

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 485 990**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/02** (2006.01)

**A01N 59/16** (2006.01)

**A01N 59/20** (2006.01)

**A01P 3/00** (2006.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2009 E 09700633 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2241186**

54 Título: **Uso de potenciador de resistencia a la enfermedad para plantas y procedimiento de control de una enfermedad de planta usando el mismo**

30 Prioridad:

**11.01.2008 JP 2008004833**

**29.08.2008 JP 2008221563**

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

**14.08.2014**

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)  
15-1, Kyobashi 1-chome Chuo-ku  
Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**IGARASHI, DAISUKE;  
TAKEDA, TAITO;  
ISHIZAKI, TAKASHI y  
TOTSUKA, KAZUHIKO**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 485 990 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

5      Usado de potenciador de resistencia a la enfermedad para plantas y procedimiento de control de una enfermedad de planta usando el mismo

5      **Campo técnico**

10     La presente invención se refiere al uso de un potenciador de resistencia a la enfermedad para plantas producido usando un microorganismo como materia prima, que es respetuoso con el medio ambiente y es seguro para usuarios y consumidores. La presente invención también se refiere a un procedimiento para controlar enfermedades de plantas.

15     **Técnica anterior**

15     Para controlar enfermedades de cultivos, además de plaguicidas, tales como bactericidas, que controlan enfermedades de plantas actuando directamente sobre los patógenos de las plantas, se usan plaguicidas (plaguicidas de tipo de inducción de la resistencia) que controlan las enfermedades de cultivos potenciando la resistencia a la enfermedad intrínseca de las plantas. Entre el tipo de plaguicidas tales como bactericidas que actúan directamente sobre los patógenos de las plantas, muchos de ellos presentan efectos bactericidas frente a los patógenos. Además, el uso continuo de los mismos a menudo provoca la emergencia de un mutante resistente a los agentes plaguicidas. Por otra parte, los plaguicidas del tipo de inducción de la resistencia no actúan directamente sobre los patógenos y, en cambio, controlan la infección de las enfermedades induciendo la resistencia de la planta. Por lo tanto, no se ha informado de casos hasta ahora en los que surjan mutantes resistentes a este tipo de plaguicidas emerged. Además, ya que los plaguicidas del tipo de inducción de la resistencia tienen una acción bactericida menor frente a los organismos, se ha pensado que es una carga para el entorno que incluye otros organismos además de plantas que son relativamente pequeños.

30     Como plaguicidas para el propósito de la inducción de la resistencia a la enfermedad de la planta, el probenazol (nombre comercial: Oryzemate), Acibenzolar-S-metilo basado en benzotiazol (BTH) (ASM, nombre comercial: Bion), tiadinilo basado en tiadiazol carboxamida (nombre comercial: V-GET) están hasta el momento en el mercado.

35     Además, como sustancias de inducción de la resistencia a la enfermedad derivadas de materiales naturales, se ha informado de productos de descomposición de polisacáridos (documento de patente 1), cerebrósidos (documento de patente 2, documento de patente 3 y Documento no de patente 1), ácido jasmónico (documento de patente 4 y Documento no de patente 2), oligosacáridos de quitina (Documento no de patente 3), oligosacáridos de  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucano (Documento no de patente 4, Documento no de patente 5 y Documento no de patente 6), ácido cólico (documento de patente 5 y Documento no de patente 8), péptidoglucano (Documento no de patente 9), lipopolisacárido (Documento no de patente 10) y similares. Estas sustancias se denominan desencadenantes y se sabe que tienen efectos que incluyen la acumulación de fitoalexinas que tienen una actividad antimicrobiana frente a patógenos, la acumulación de proteínas PR (proteínas relacionadas con patogénesis) tales como quitinasa y  $\beta$ -13-glucanasa que digieren las paredes celulares de los patógenos y la inducción de muerte celular hipersensible (Documento no de patente 3 y Documento no de patente 7).

45     Además, se conoce un procedimiento para controlar la infección de patógenos por pulverización de sobrenadante de una solución de fermentación de prolina por *Corynebacterium* (documento de patente 6). Además, no se conoce ningún efecto de una solución obtenida por tratamiento térmico de microorganismos en condiciones ácidas.

50     Documento de patente 1: JP 5-331016A

50     Documento de patente 2: JP2846610B

50     Documento de patente 3: WO 98/47364

55     Documento de patente 4: JP11-29412A

55     Documento de patente 5: JP2006-219372A

55     Documento de patente 6: JP 6-80530A

60     Documento no de patente 1; Koga J. et al, J. Biol. Chem., 1998, 48, 27, p. 31985-31991

60     Documento no de patente 2: Nojiri H. et al., Plant Physiol., 1996, 110, p. 387-392

65     Documento no de patente 3: Yamada A, et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 1993, 57, 3, p. 405-409

65     Documento no de patente 4: Sharp J. K. et al., J. Biol. Chem., 1984, 259, p. 11312-11320

Documento no de patente 5: Sharp J. K. et al., J. Biol. Chem., 1984, 259, p. 11321-11336

Documento no de patente 6: Yamaguchi T. et al., Plant Cell, 2000, 12, p. 817-826

Documento no de patente 7: Keen N. T., Plant Mol. Biol., 1992, 19, p. 109-122

Documento no de patente 8: Koga J. et al., Plant Physiol 2006, 140, p.1475-1483

Documento no de patente 9: Gust A. A. et al., J. Biol. Chem., 2007, 2007 en imprenta

Documento no de patente 10: Newman M, A Plant J. 2002, 29, p. 487-495.

### Divulgación de la invención

Un objetivo de la presente invención es, en vista de los antecedentes mencionados anteriormente, proporcionar el uso de un potenciador de resistencia a la enfermedad para plantas, que sea seguro para consumidores y usuarios, y económico, así como proporcionar un procedimiento para el control de enfermedades de plantas usando un potenciador de este tipo.

Los presentes inventores, aunque buscaban una sustancia de inducción de la resistencia a la enfermedad, descubrieron que un extracto obtenido por tratamiento térmico de microorganismos en una solución ácida tenía una actividad de inducción de la resistencia a la enfermedad alta. Esto es, observaron que el tratamiento con el extracto a las plantas indujo la producción de oxígeno reactivo, un incremento en la actividad de quitinasa y en la actividad de glucanasa, y descubrieron que se desencadenaba una inducción de la resistencia a la enfermedad significativa. Además, descubrieron que el extracto tenía un fuerte efecto de control frente a la infección de añublo del arroz y Brassicaceae *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. Los presentes inventores también descubrieron que la adición de un metal tal como cinc y/o cobre incrementó además la inducción de la resistencia a la enfermedad por el extracto o mantiene el efecto durante un tiempo mayor. En base a los hallazgos anteriores, se completó la presente invención.

La presente invención proporciona lo siguiente:

(1) Uso de una composición que comprende un extracto de célula microbiana, en el que dicho extracto se obtiene por tratamiento térmico de células de un microorganismo en una solución ácida, como potenciador de resistencia a la enfermedad para plantas.

(2) Uso de acuerdo con (1), en el que dicho tratamiento térmico en una solución ácida es un tratamiento térmico a 70 °C o mayor en una solución que tiene un pH de 6 o menos.

(3) Uso de acuerdo con (1) o (2), en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en bacterias *Escherichia*, bacterias *Corineformes*, bacterias *Pantoea*, bacterias *Bacillus*, levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas.

(4) Uso de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), en el que el potenciador de resistencia a la enfermedad es un agente de pulverización foliar.

(5) Uso de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) en el que dicha composición contiene además un metal.

(6) Uso de acuerdo con (5), en el que dicho metal es cinc y/o cobre.

(7) Un procedimiento para controlar una enfermedad de planta que comprende tratar una planta con el potenciador de resistencia a la enfermedad de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (6).

### Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 muestra el efecto de una solución tratada de *Corynebacterium* sobre la actividad de quitinasa o la actividad de glucanasa de *Arabidopsis thaliana*. La actividad se muestra cuando se pulverizó sobre las hojas un control (un grupo en el que se pulverizó sobre las hojas un agente de propagación solo) (C), una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* (1), una solución tratada térmicamente de *Corynebacterium* sin ajuste de pH (pH 6,3) (2), o una solución no tratada de *Corynebacterium* (pH 6,3) (3).

[Figura 2] La Figura 2 muestra el efecto de una solución tratada de *E. coli* sobre una actividad de quitinasa o actividad de glucanasa de *Arabidopsis thaliana*. La actividad se muestra cuando se pulverizó sobre las hojas un control (un grupo en el que se pulverizó sobre las hojas un agente de propagación solo) (C), una solución tratada térmicamente ácida de *E. coli* (1), una solución tratada térmicamente de *E. coli* sin ajuste de pH (pH 6,3) (2), o una

solución no tratada de *E. coli* (pH 6,3) (3).

[Figura 3] La Figura 3 muestra el efecto de una solución tratada de *Bacillus* (A) o *Pantoea* (B) sobre una actividad de quitinasa de *Arabidopsis thaliana*. La actividad se muestra cuando se pulverizó sobre las hojas un control (un grupo en el que se pulverizó sobre las hojas un agente de propagación solo) (C) o una solución tratada térmicamente ácida (1).

[Figura 4] La Figura 4 muestra el efecto de una solución tratada de *Corynebacterium* sobre una actividad de quitinasa de *Arabidopsis thaliana*. La actividad se muestra cuando se pulverizó sobre las hojas un control (un grupo en el que se pulverizó sobre las hojas un agente de propagación solo) (C), una suspensión de células de *Corynebacterium* (pH 6) (1), una solución en la que la suspensión de células de *Corynebacterium* (pH 6) se trató térmicamente a 75 °C durante 60 minutos (2), o una solución en la que la suspensión de células de *Corynebacterium* (pH 6) se trató térmicamente a 95 °C durante 60 minutos (3). En este experimento, se examinó el efecto del tratamiento térmico usando una solución en la que se diluyó 10 veces la solución tratada de células bacterianas.

[Figura 5] La Figura 5 muestra el efecto de una solución tratada de lodo activado sobre una actividad de quitinasa de *Arabidopsis thaliana*. La actividad se muestra cuando se pulverizó sobre las hojas un control (un grupo en el que se pulverizó sobre las hojas un agente de propagación solo) (C) o una solución tratada diluida 20 veces de lodo activado (1).

[Figura 6] La Figura 6 muestra el efecto de una solución tratada de *Corynebacterium* y cinc sobre una actividad de quitinasa o actividad de glucanasa de *Arabidopsis thaliana*. La actividad se muestra cuando se pulverizó sobre las hojas un control (un grupo en el que se pulverizó sobre las hojas un agente de propagación solo) (C), una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* (1), una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* + cinc (0,01 % p/v) (2), o cinc (0,01 % p/v) (3). Los gráficos superiores indican los resultados 24 horas después del tratamiento y los gráficos inferiores indican los resultados 72 horas después del tratamiento.

[Figura 7] La Figura 7 muestra el efecto de una solución tratada de *E. coli* y cinc sobre una actividad de quitinasa o actividad de glucanasa de *Arabidopsis thaliana*. La actividad se muestra cuando se pulverizó sobre las hojas un control (un grupo en el que se pulverizó sobre las hojas un agente de propagación solo) (C), una solución tratada térmicamente ácida de *E. coli* (1), una solución tratada térmicamente ácida de *E. coli* + cinc (0,01 % p/v) (2), o cinc (0,01 % p/v) (3).

[Figura 8] La Figura 8 muestra el efecto de una solución tratada de *Corynebacterium* o *E. coli* y cobre sobre una actividad de quitinasa de *Arabidopsis thaliana*. La actividad se muestra cuando se pulverizó sobre las hojas un control (un grupo en el que se pulverizó sobre las hojas un agente de propagación solo) (C), una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* (1), una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* + Cu (0,01 % p/v) (2), una solución tratada térmicamente ácida de *E. coli* (3), o una solución tratada térmicamente ácida de *E. coli* + Cu (0,01 % p/v) (4).

[Figura 9] La Figura 9 muestra el efecto de péptidoglucano (A) o LPS (B) sobre una actividad de quitinasa de *Arabidopsis thaliana*. La actividad se muestra cuando se pulverizó sobre las hojas un control (un grupo en el que se pulverizó sobre las hojas un agente de propagación solo) (C), péptidoglucano (100 mg/l) (1 en (A)) o LPS (100 mg/l) (1 en (B)).

[Figura 10] La Figura 10 muestra el efecto de sobrenadante de una solución de fermentación de prolina (50 ppm de aminoácido) sobre una actividad de quitinasa o actividad de glucanasa de *Arabidopsis thaliana*. La actividad se mostró cuando se pulverizó sobre las hojas un control (un grupo en el que se pulverizó sobre las hojas un agente de propagación solo) (C) o el sobrenadante de una solución de fermentación de prolina (50 ppm de aminoácido) (1).

[Figura 11] La Figura 11 muestra el efecto del control de una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* sobre la infección de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* a *Arabidopsis thaliana*. (A) es una fotografía de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Dos hojas en la izquierda no se trataron (control) mientras que dos hojas en la derecha se infectaron con un patógeno después de pretratarse con la solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium*. (B) es la unidad de formación de colonias por peso fresco de la hoja.

[Figura 12] La Figura 12 muestra el efecto de una solución tratada térmicamente ácida de cada microorganismo sobre una actividad de quitinasa de arroz. La actividad se muestra cuando se pulverizó sobre las hojas con un control (un grupo en el que se pulverizó sobre las hojas un agente de propagación solo) (C), una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* (1), una solución tratada térmicamente ácida de *E. coli* (2), una solución tratada térmicamente ácida de *Pantoea* (3), o una solución tratada térmicamente ácida de *Bacillus* (4).

[Figura 13] La Figura 13 muestra un efecto del control de una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* sobre la infección de añublo del arroz. Se realizó el pretratamiento usando un control (un grupo en el que se pulverizó un agente de propagación APPLAUCH BI (Kao Corporation)) (C) o uno en el que se añadió una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* en el agente de propagación (1). El eje y en el gráfico

indica el número de lesiones por hoja.

[Figura 14] La Figura 14 muestra una cantidad de oxígeno reactivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generado por una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* en espárragos, fresas y uvas. Se llevó a cabo el tratamiento sobre las hojas de cada planta y se midió la cantidad del oxígeno reactivo generado. Los valores se indican en unidades de unidades fluorescentes relativas (RFU). Se muestra la cantidad del oxígeno reactivo generado cuando se trató un control (C) o una solución (100 ppm) (1) después de que una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* se sometiera a fraccionamiento molecular (no menos de 5 kDa y no más de 30 kDa).

[Figura 15] La Figura 15 muestra el efecto de una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* sobre una actividad de quitinasa de col. Se inyectó la solución tratada en hojas de col cultivada durante 3 semanas después de sembrarse. Se midió una actividad de quitinasa 48 horas después. Se muestra la actividad cuando se trató un control (C) o una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* (1).

[Figura 16] La Figura 16 muestra el efecto de una solución tratada térmicamente ácida de *Saccharomyces cerevisiae* sobre una actividad de glucanasa de arroz. Se muestra la actividad cuando se trató un control (C) o una solución tratada térmicamente ácida de *Saccharomyces cerevisiae* (1).

[Figura 17] La Figura 17 muestra el efecto del control de una solución tratada térmicamente ácida de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la infección de añublo del arroz. Se realizó el pretratamiento usando un control (un grupo en el que se pulverizó un agente de propagación APPLAUCH BI (Kao Corporation)) (C) o uno en el que se añadió una solución tratada térmicamente ácida de *Saccharomyces cerevisiae* en el agente de propagación (1). La ordenada de un gráfico indica el número de lesiones por hoja.

[Figura 18] La Figura 18 muestra el efecto de inducción de la expresión del gen de resistencia a la enfermedad por el tratamiento de raíces de arroz con una solución tratada térmicamente ácida de células bacterianas. Se muestra la cantidad de expresión del gen PBZ1 normalizada con la cantidad de expresión de RAc1 cuando se trató un control (C) o una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* (1).

### 30 Modos de realización preferentes de la invención

En la presente invención, los microorganismos pueden ser eucariotas tales como levaduras u hongos, o procariotas tales como bacterias o actinomicetos, y pueden ser gram-positivos o bien gram-negativos. Preferentemente, se pueden usar bacterias Corineformes, las bacterias *Bacillus*, las bacterias *Escherichia*, las bacterias *Pantoea*, bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas, levaduras o similares.

Ejemplos de bacterias corineformes incluyen las bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium alkanolyticum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium caliunae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium lillium*, *Corynebacterium melassecola*, *Corynebacterium thermoaminogenes* o *Corynebacterium hirculis*; las bacterias *Brevibacterium* tales como *Brevibacterium divarication*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium saccharolyticum*, *Brevibacterium thiogenitalis*, *Brevibacterium album* o *Brevibacterium cerinum*; y las bacterias *Microbacterium* tales como *Microbacterium ammoniaphilum*.

Un ejemplo de bacterias *Escherichia* incluye *Escherichia coli* (*E. coli*).

Un ejemplo de bacterias *Pantoea* incluye *Pantoea ananatis*.

Ejemplos de bacterias *Bacillus* incluyen *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus pumilus*.

Ejemplos de levaduras incluyen levaduras *Saccharomyces* tales como *Saccharomyces cerevisiae*; levaduras *Pichia* tales como *Pichia pastoris*; levaduras *Hansenula* tales como *Hansenula polymorpha*; levaduras *Candida* tales como *Candida utilis*; y levaduras *Schizosaccharomyces* tales como *Schizosaccharomyces pombe*.

Ejemplos de bacterias ácido lácticas incluyen bacterias *Lactobacillus* tales como *Lactobacillus casei*, bacterias *Lactococcus* tales como *Lactococcus lactis* y bacterias *Bifidobacterium* tales como *Bifidobacterium bifidum*.

Un ejemplo de bacterias ácido acéticas incluye bacterias *Acetobacter* tales como *Acetobacter aceti*.

En la presente invención, el tratamiento térmico ácido se puede obtener por tratamiento térmico en una solución ácida que tiene preferentemente un pH de 6 o menos, más preferentemente un pH de 5 o menos, preferentemente además un pH de 4 o menos, en particular preferentemente un pH de 3 o menos. El límite inferior es un pH de 1. Las condiciones de calentamiento no están limitadas pero, en general, se llevan a cabo en el intervalo de 70 °C-200 °C. Es preferente que se lleve a cabo el tratamiento térmico preferentemente a 75 °C o más, más preferentemente 90 °C o más, preferentemente además a 100 °C o más, en particular preferentemente 120 °C o más. Se puede llevar a

cabo el calentamiento usualmente durante de 1 a 120 minutos, preferentemente durante de 10 a 60 minutos.

Es preferente que se lleve a cabo el calentamiento después de suspender las células microbianas en agua, un tampón o un medio y a continuación acidificar la suspensión resultante. Además, se puede llevar a cabo el calentamiento después de acidificar el medio de cultivo que contiene la célula microbiana después de la terminación del cultivo. Por ejemplo, se puede llevar a cabo el calentamiento después de acidificar el medio de cultivo (solución de fermentación) que contiene las células microbianas, cuando se usan células microbianas para producir sustancias tales como aminoácidos por fermentación. Además, se puede llevar a cabo el calentamiento después de suspender un lodo orgánico que contiene microorganismos o similares en agua o tampón y acidificar la suspensión resultante. Ejemplos del lodo orgánico incluyen lodo de depuradora descargado de una instalación de tratamiento de aguas residuales común, lodo descargado de un aparato de tratamiento biológico para diversas aguas residuales orgánicas, así como lodo en exceso y productos deshidratados de los mismos. Cuando se lleva a cabo el tratamiento térmico ácido, es preferente que las células microbianas se suspendan a una concentración de 50 mg-200 g (peso seco)/l.

Se puede usar un extracto obtenido por tratamiento térmico ácido de un microorganismo (a continuación en el presente documento denominado solución tratada térmicamente ácida) como potenciador de resistencia a la enfermedad después de la retirada de células bacterianas por centrifugación, separación de membrana o similares, o se puede usar mientras contiene las células bacterianas.

Se puede ajustar la concentración de aplicación del potenciador de resistencia a la enfermedad de la presente invención diluyendo o concentrando hasta una concentración apropiada dependiendo del tipo de plantas, la fase de crecimiento de la planta o el procedimiento de aplicación. Además, se puede usar una fracción resultante del fraccionamiento por peso molecular.

La actividad para inducir resistencia a la enfermedad de la planta puede significar una serie de reacciones representadas por la producción de oxígeno reactivo, acumulación de proteínas antibacterianas y compuestos antibacterianos, fortalecimiento de la pared celular y acumulación de enzimas bactericidas, tales como quitinasa y glucanasa. Cuando se infectan por bacterias, bacterias filamentosas, o similares, las plantas a menudo desencadenan las anteriores series de reacciones para controlar la propagación de la infección. Se puede evaluar la actividad midiendo la actividad enzimática de quitinasa o glucanasa y midiendo el oxígeno reactivo de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección de Ejemplos de esta descripción adicionalmente, se puede llevar a cabo la evaluación examinando una cantidad de expresión de un gen relacionado con la resistencia a la enfermedad tal como el gen *PBZ1* usando RT-PCR o similares.

Los ejemplos de un procedimiento para aplicar un potenciador de resistencia a la enfermedad de la presente invención incluyen pulverizar un cuerpo de planta (agentes de pulverización foliar o similar), tratamiento por pulverización, tratamiento por inmersión para raíces y tratamiento de mezclado para el suelo. Además, debido a que el procedimiento para controlar enfermedades de plantas de la presente invención ayuda principalmente en la prevención de las enfermedades, es preferente que se use el procedimiento antes de que comience la enfermedad. Sin embargo, incluso después del comienzo de la enfermedad, se pueden esperar efectos de bloqueo de su propagación y de debilitamiento de la enfermedad.

El potenciador de resistencia a la enfermedad de la presente invención puede contener otros ingredientes. Los ejemplos de los otros ingredientes incluyen metales tales como cinc y cobre. Aunque la pulverización de la solución tratada térmicamente ácida de microorganismos sola puede ejercer el efecto, la adición de metal tal como cinc y cobre potencia o prolonga el efecto. Es preferente que la concentración del metal esté en un intervalo de concentración del 0,0001 % - 10 % (p/v) (para peso de metal) en el momento de la aplicación. Es preferente que el metal tal como cinc y cobre se añada al potenciador de resistencia a la enfermedad de la presente invención en forma de sales para formar iones en la solución.

Los cultivos sometidos al potenciador de resistencia a la enfermedad de la presente invención no están limitados en particular y se puede someter cualquier planta cultivada general. Los ejemplos de los mismos incluyen las plantas poáceas (tales como arroz, cebada, trigo, maíz, avena o césped), las plantas solanáceas (tales como tomate, berenjena o patata), las plantas cucurbitáceas (tales como pepino, melón o calabaza), las leguminosas (tales como guisante, soja, frijol, alfalfa, cacahuete, haba), las plantas brasicáceas (tales como rábano daikon, col china, col, komatsuna, flores de colza, bok choy o *Arabidopsis thaliana*), las plantas rosáceas (tales como fresa, manzano o peral), las moráceas (tales como morera), las malváceas (tales como algodón), las umbelíferas (tales como zanahoria, perejil o apio), las liliáceas (tales como cebolleta, cebolla o espárrago), las compuestas (tales como bardana, girasol, crisantemo, margarita corona, cártamo, lechuga) y las vitáceas (tales como uva).

Puesto que la reacción que da lugar a la resistencia a la enfermedad de la planta, en general, es inespecífica para patógenos, todas las enfermedades de plantas provocadas por hongos, bacterias y virus están incluidas como enfermedades objeto. Los ejemplos de las mismas incluyen enfermedades provocadas por *Magnaporthe grisea*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Spongopora subterranea*, *Phytophthora infestans*, *Peromspora manshurica*, *Eryshiphe graminis* f. sp. *hordei*, *Eryshiphe graminis* f. sp. *tritici*, *Gibberella zeae*,

*Mycosphaerella pinodes*, *Sclerotinia borealis*, *Puccinia recondita*, *Ustilago maydis*, *Ceratobasidium gramineum*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Cercospora kikuchii*, *Fusarium oxysporum* f. sp. batatas, *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis, *Fusarium oxysporum* f. sp. lactucae, *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici, *Fusarium oxysporum* f. sp. spinaciae, *Verticillium dahliae*, *Plasmiodiophora brassicae*, *Pythium debaryanum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum phomoides*, *Hordeum vulgare*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Erwiniasubsp. atroseptica*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Streptomyces scabies*, virus del mosaico del trigo transmitido por el suelo, virus del mosaico de la soja, virus del mosaico de la alfalfa y virus del enrollado de la hoja de la patata.

Se puede usar el potenciador de resistencia a la enfermedad de la presente invención sobre plantas en cualquier forma tal como solución, polvos, gránulos, emulsión, polvos humectables, aceite, aerosol, fluido mezclando la solución tratada térmicamente ácida de microorganismos con aditivos apropiados. Además, opcionalmente, se puede ajustar el pH del mismo añadiendo un tampón, y se pueden modificar las propiedades tales como las propiedades de penetración en la plantas o las propiedades de propagación añadiendo un agente de propagación, tensioactivo o similares.

Ahora se describirá la presente invención de forma concreta por medio de los ejemplos de la misma. Sin embargo, la presente invención no está limitada a los ejemplos.

### Ejemplos

Ejemplo 1. Procedimiento para preparar un potenciador de resistencia a la enfermedad para plantas derivado de microorganismos

*Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pantoea ananatis*, *Bacillus subtilis* o *Saccharomyces cerevisiae* se usó como células microbianas. se cultivó hasta aproximadamente 1,5-2,0 g (peso seco) por 100 ml de medio de cultivo. Para el cultivo, se usó el medio descrito en el documento JP 2005-278643, JP 2003-259861, WO01/090310 o similares.

Se recogieron las células bacterianas por centrifugación a 6000 rpm, se lavaron con agua tres veces y a continuación se suspendieron en 100 ml de agua por 1,5-2,0 g (peso seco). Se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para ajustar hasta un pH de 3,2 y a continuación se sometió a tratamiento térmico usando una autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Se centrifugó la solución resultante a 10.000 rpm para retirar materiales insolubles. Se usó el sobrenadante obtenido en los experimentos a continuación como la "solución tratada térmicamente ácida". A menos que se describa de otro modo, para tratar las plantas se usó una solución diluida 100 veces.

Ejemplo 2. Evaluación de la inducción de la resistencia a la enfermedad de la planta usando actividad catalítica como índice

(1) Procedimiento de cultivo de la planta y pulverización

Se obtuvo el cultivo en agar de *Arabidopsis thaliana* en medio que contenía medio de cultivo salino inorgánico OptMS (Tabla 1) complementado con sacarosa al 1 % y agar al 0,8 %, se usaron plantas cultivadas durante 2 semanas. Se llevó a cabo el cultivo con un ciclo diurno de periodo de luz de 16 horas a la intensidad de luz de aproximadamente 70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para el cultivo en lana de roca de *Arabidopsis thaliana*, se usaron 5 cm cuadrados de lana de roca (fabricado por Nittobo, tamaño V). Como fertilizante, se usó medio de cultivo salino inorgánico OptMS (tabla 1). Se llevó a cabo el cultivo con un ciclo diurno de periodo de luz de 14 horas a la intensidad de luz de aproximadamente 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 21 días. De entre las partes aéreas, se usaron como muestras todas menos los pecíolos de las hojas. Se evaluaron los efectos de pulverización de cada solución para una planta cultivada en el medio agar o lana de roca. A menos que se describa de otro modo, se trató la planta con una dilución de 100 veces de la solución preparada por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 para medir la actividad enzimática en las hojas 24 horas después del tratamiento. Se añadió una concentración diluida 1000 veces de APPLAUCH BI (Kao Corporation) como agente de propagación a la solución de pulverización.

Tabla 1

KPO <sub>4</sub> (pH 5,7)	2,5 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,5 mM
KNO <sub>3</sub>	2 mM
KCl	2 mM

(continuación)

micronutrientes	
Fe(III)-EDTA	0,1 mM
MnCl <sub>2</sub>	0,1 mM
CuSO <sub>4</sub>	0,5 µM
ZnSO <sub>4</sub>	30 µM
NaMoO <sub>4</sub>	1 µM
CoCl <sub>2</sub>	0,1 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>2</sub>	0,1 mM
NaCl	10 µM

## (2) Extracción de enzima

5  
10  
15  
Inmediatamente después de que se tomaran muestras de la planta para la medida de la actividad enzimática, se congelaron las muestras con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Se rompieron las muestras congeladas usando un molino mezclador de plantas MM300 (QIAGEN) y se disolvieron en 500 µl de un tampón de extracción [Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM (pH 6,0) DTT 1 mM, inhibidor de proteasas/mini EDTA completo libre (Roche)]. Después de la centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos, se pasó el sobrenadante a través de un filtro de 0,22 µm para retirar los materiales insolubles. Se pasó la solución resultante a través de un filtro de ultrafiltración UFV5BG00 (Millipore) para concentrar y desalar adicionalmente. Se realizó el desalado pasando 1,5 ml del tampón de extracción tres veces. Se usó la fracción así obtenida como fracción de extracto en bruto, que se sometió a medida de concentración de proteínas por el procedimiento de Bradford y a continuación se usó para la medida de la actividad enzimática.

## (3) Medida de la actividad de quitinasa

20  
25  
30  
Se determinó la actividad de quitinasa por el procedimiento por McCreath et al. (J. Microbiol. Methods 14:229-1992). Se disolvió un sustrato 4MU-(GlcNAc)<sub>3</sub> (SIGMA M5639) en etanol al 50 % hasta una concentración final de 0,4 mM y se almacenó a -20 °C. Cuando se usó, se diluyó 10 veces para obtener una solución de sustrato. Se ajustó la solución de extracto en bruto hasta 6-8 µg/µl y se usaron 50 µl de la solución para la reacción. Después de la preincubación sobre una placa de 96 pocillos a 37 °C durante 10 minutos, se añadieron 50 µl de la solución de sustrato y se inició la reacción a 37 °C. 30 minutos y 150 minutos después del inicio de la reacción, se añadieron 100 µl de tampón Gly/NaOH 1 M (pH 10,2) a la mezcla de reacción para terminar la reacción. Se llevaron a cabo la reacción y la terminación en una placa de 96 pocillos con un volumen final de 200 µl. Se retiraron completamente las burbujas sobre la superficie de la solución y a continuación se midió la intensidad de fluorescencia usando un lector de placas para detección fluorescencia (WALLAC 1420 ARVO-SX). Se realizó la medida de la fluorescencia empleando 360 nm para la excitación y 450 nm para la emisión. La cantidad de reacción se basó en un valor estándar determinado usando 4-MU (metilumbeliferona) como sustrato, y la cantidad de enzima que reaccionó con 1 µmol durante 1 minuto se definió como 1 unidad.

## (4) Medida de actividad de glucanasa

35  
40  
45  
La medida de una actividad de glucanasa en *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento por Aono et al. (Appl Environ Microbiol. 58:520-1992). Se empleó un procedimiento para romper la laminarina que es un polisacárido soluble. Se disolvió un sustrato, laminarina (SIGMA L9634) en agua esterilizada hasta una concentración final de 5 mg/ml y se almacenó a -20 °C. Se ajustó la solución de extracto en bruto hasta 6-8 µg/µl y se añadieron 50 µl de la solución a 50 µl de la solución de sustrato para iniciar la reacción a 37 °C. 180 minutos y 360 minutos después del inicio de la reacción, se añadieron 100 µl de la mezcla de reacción a 500 µl de solución de DNS (5 g/l de ácido dinitrosalicílico, 16 g/l de NaOH, 300 g/l de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado) y se calentó la mezcla a 98 °C durante 10 minutos y a continuación se enfrió en hielo hasta el desarrollo de color. Se llevó a cabo el procedimiento de DNS por el procedimiento por Miller et al. (Anal Chem 31:426-1959). Después de la coloración, se determinó la actividad en base a la absorbancia a 540 nm. Se basó la cantidad de reacción en un valor estándar determinado usando glucosa como sustrato, y la cantidad de enzima que reaccionó con 1 µmol durante 1 minuto se definió como 1 unidad.

50  
Los resultados de la evaluación de la planta pulverizada con la solución tratada térmicamente ácida de células de *Corynebacterium* se muestran en la Figura 1. En comparación con las células bacterianas que se sometieron únicamente a tratamiento térmico o con ácido, se descubrió que la pulverización de la solución sometida a calor y ácido incrementa drásticamente la actividad de quitinasa/glucanasa. Los resultados de la evaluación llevada a cabo usando células *E. coli* se muestran en la Figura 2. Similar a la evaluación con *Corynebacterium*, el tratamiento térmico en condiciones ácidas dio como resultado una extracción muy eficaz de sustancias que inducen la resistencia a la enfermedad. De forma similar, se evaluaron las soluciones tratadas térmicamente de células de

*Pantoea* o *Bacillus* en condiciones ácidas. Como se muestra en la Figura 3, en ambos casos, se observó un incremento en la actividad de quitinasa, lo que indica que ambos presentaron el efecto de inducción de resistencia a la enfermedad.

5 Los resultados de la evaluación de una planta pulverizada con la solución tratada térmicamente ácida de células de *Corynebacterium*, que se obtuvo por tratamiento térmico en una solución con pH 6, se muestran en la Figura 4. Como resultado, aún con la solución obtenida calentando a pH 6 y 75 °C, se observó un incremento en la actividad de quitinasa, lo que indica que la solución presentó el efecto de inducción de resistencia a la enfermedad.

10 Además, se deshidrató el lodo en exceso producido a partir de un aparato de tratamiento de lodo activado de vertidos industriales que contiene, como ingrediente principal, residuo de fermentación de aminoácidos. Se añadió el lodo resultante con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acuoso, se ajustó hasta pH 3,2 y a continuación se sometió a un tratamiento térmico de 121 °C durante 20 minutos. A continuación, se centrifugó la solución obtenida a 10.000 rpm y se retiraron los ingredientes insolubles. Los resultados usando este sobrenadante como solución tratada  
15 térmicamente ácida se muestran en la Figura 5. Como resultado, se descubrió que la solución tratada térmicamente ácida de microorganismos contenida en el lodo en exceso también presentó el efecto de inducción de resistencia a la enfermedad.

A partir de estos resultados, se descubrió que el tratamiento de varias células microbianas con calor en condiciones  
20 ácidas dió como resultado la extracción de sustancias que inducen la resistencia a la enfermedad.

Las Figuras 6 y 7 muestran experimentos en los que se mezcló ZnSO<sub>4</sub> en la solución de pulverización hasta una  
25 proporción en peso de Zn de 0,01 %. Cuando se compara la solución tratada térmicamente ácida de células bacterianas sola o Zn solo, el incremento en la actividad enzimática fue más fuerte con la combinación de la solución tratada térmicamente ácida de células bacterianas con Zn. Este efecto se observó tanto en células de *Corynebacterium* (Figura 6) como de *E. coli* (Figura 7) y en particular el efecto sobre la actividad de glucanasa fue significativo. Además, el efecto a las 72 horas fue más significativo que a las 24 horas después del tratamiento, lo que indica que la adición de Zn fue eficaz para mantener el efecto durante un periodo de tiempo largo.

30 Los resultados en la evaluación con CuSO<sub>4</sub> mezclado en la solución de pulverización hasta una proporción en peso de Cu de 0,01 % se muestran en la Figura 8. Como resultado, cuando se añadió Cu a varias soluciones tratadas térmicamente ácidas de células bacterianas, el incremento en la actividad enzimática fue aún mayor.

35 Comparación del ejemplo comparativo con los efectos de la sustancia conocida que inducen resistencia a la enfermedad

Previamente, se ha informado de que el péptidoglucano y el lipopolisacárido (LPS), que constituyen las paredes de  
40 las células bacterianas, eran reconocidos por las plantas e indujeron resistencia a la enfermedad. Se compararon los efectos de estos inductores conocidos con los descritos anteriormente. Se usó una muestra estándar de péptidoglucano fabricado por InvivoGen (PGN-ECndss ultrapure) y se usó una muestra estándar de lipopolisacárido fabricado por Sigma (L8643). Cada una de estas muestras se pulverizó sobre las hojas de *Arabidopsis thaliana* a la concentración eficaz informada de 100 mg/l, y 24 horas después se midió una actividad enzimática. Como se muestra en la Figura 9, no se observó ningún incremento en la actividad de quitinasa. Por tanto, se descubrió que el efecto de inducción de resistencia a la enfermedad con la solución tratada térmicamente ácida de células  
45 bacterianas pulverizada sobre las hojas fue significativamente más fuerte que el inducido por esas sustancias.

Además, previamente se había informado de que la pulverización de un sobrenadante de una solución de  
50 fermentación de prolina (Pro) puede controlar la infección de patógenos (documento JP 6-80530). Por lo tanto, esto se examinó y se comparó con la solución tratada térmicamente ácida de células bacterianas de la presente solicitud. Se cultivaron células bacterianas productoras de Pro (*Corynebacterium glutamicum* ATCC21159) por un procedimiento descrito en el documento JP 6-80530. Se analizaron los aminoácidos usando un analizador de aminoácidos (Hitachi, Ltd, L-8800). Para tratar los cuerpos de las plantas, se usó una solución diluida de modo que la cantidad total de aminoácidos era de 50 ppm. Como se muestra en la Figura 10, no se observó ningún incremento  
55 significativo en la actividad enzimática cuando se pulverizó el sobrenadante de la solución de fermentación de Pro sobre las hojas.

Ejemplo 3. Efecto para el control de la infección de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* en *Arabidopsis thaliana*

60 Se cultivó un patógeno, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* en medio YEP durante 24 horas. después del cultivo, se recogieron células bacterianas a 3.000 rpm y se suspendieron en solución de MgSO<sub>4</sub> 10 mM hasta 5x10<sup>6</sup> cfu/ml. Se infiltró la suspensión de células bacterianas en hojas con una jeringuilla de 1 ml sin aguja para la infección. Tres días después, se confirmó que las hojas estaban infectadas.

65 En la prueba, se llevó a cabo el pretratamiento pulverizando un agente de propagación solo o pulverizando el agente de propagación con una solución tratada térmicamente ácida. 24 horas después, se añadió el patógeno. Como se muestra en la Figura 11, se descubrió que la infección se inhibió significativamente con el agente de propagación

con la solución tratada térmicamente ácida, en comparación con el agente de propagación solo.

Ejemplo 4. Inducción de la resistencia a la enfermedad en arroz y efecto del control en la infección por el añublo del arroz

5

(1) Procedimiento de cultivo de arroz y pulverización

Se sumergieron semillas de arroz (variedad: Nipponbare) en agua durante tres días para estimular la germinación, se sembraron en moldes para horticultura (mezcla 4:1 de Power Soil (Kanto Hiryou industries (Kureha Chemical industries)) y vermiculita (S.K.Agri)) y se cultivaron en un invernadero. El cultivo tuvo lugar durante 14 días con luz natural el invernadero y se usó como muestra una planta que tenía una edad foliar de 4,5 hojas verdaderas.

10

(2) Medida de actividad de glucanasa

Se midió la actividad de glucanasa en arroz por el procedimiento de Inui et al. (Biosci Biotechnol Biochem. 61:975-1997). Se dispusieron 2 µl de la muestra (solución tratada térmicamente ácida) en cada uno de los sitios frecuentes sobre la superficie de la cuarta hoja verdadera de una planta que tiene una edad foliar de 4,5 hojas verdaderas. Se congeló la hoja 24 horas después usando nitrógeno líquido y se sometió a extracción con homogenización. A 100 µl de la solución de extracto en bruto, se le añadieron 900 µl de la solución de sustrato (1 % Curdlan (SIGMA C7821), tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-citríco 50 mM, (pH 5,0)) para iniciar una reacción a 37 °C. 60 minutos después del comienzo de la reacción, se añadieron 50 µl de la mezcla de reacción a 200 µl de solución de DNS (5 g/l de ácido dinitrosalicílico, 16 g/l de NaOH, 300 g/l de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado) y se calentó la mezcla a 98 °C durante 10 minutos y a continuación se enfrió en hielo hasta el desarrollo de color. Se llevó a cabo el procedimiento de DNS de acuerdo con el procedimiento de Miller et al. (Anal Chem 31:426-1959). Después de la coloración, se determinó la actividad en base a la absorbancia a 540 nm. Se basó la cantidad reactiva en un valor estándar determinado usando glucosa como sustrato, y la cantidad de enzima que reaccionó con 1 µmol durante 1 minuto se definió como 1 unidad.

15

20

25

Se trató el arroz con la solución de células de *Corynebacterium* que se trató térmicamente en condiciones ácidas, solución que se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 y se aplicó sin diluirse, y se midió la actividad de glucanasa después de 24 horas. Como se muestra en la Figura 12, se demostró que la actividad de glucanasa disminuyó significativamente al pulverizar la solución tratada térmicamente ácida de las células bacterianas, en comparación con el control.

30

(3) Efecto del control en la infección por añublo del arroz en arroz

35

Se pulverizó una muestra de la solución tratada térmicamente ácida de células de *Corynebacterium* preparadas de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 y diluida 10 veces sobre una hoja completa de arroz que tenía una edad foliar de 4,5 hojas verdaderas. Después de un cultivo de 24 horas, se pulverizó una suspensión de conidios (1 x 10<sup>5</sup> conidios/ml) de patógeno de añublo del arroz (nombre científico: *Magnaporthe oryzae*) para infectar. Después de pulverizar para infectar, se dejó reposar la muestra durante 24 horas en una habitación oscura, húmeda, para que se infectara con el patógeno del añublo del arroz. Seis días después de la infección, se calculó un valor preventivo midiendo el número de lesiones susceptibles que aparecieron sobre la cuarta hoja verdadera de cada grupo de tratamiento. El valor preventivo se calculó como sigue: valor preventivo = (media del número de lesiones en el grupo de control - media del número de lesiones en cada grupo tratado con una muestra / media del número de lesiones en el grupo de control) x 100. Como se muestra en la Figura 13, se descubrió que, en comparación con el grupo de control, la pulverización de la solución tratada térmicamente ácida de células bacterianas pudo controlar significativamente la infección patógena.

40

45

Ejemplo 5. Evaluación de la inducción de la resistencia a la enfermedad usando la producción de oxígeno reactivo como índice en diversas plantas

50

Se sembró cada planta en soil-Metromix (Hyponex Japan Co., Ltd.) y se cultivó a una intensidad de luz de aproximadamente 100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> con un ciclo de un periodo de luz de 14 horas y un periodo de oscuridad de 10 horas a 23 °C durante 21 días. Se usaron hojas verdaderas frescas para su evaluación.

55

Se llevó a cabo la medida de oxígeno reactivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por un procedimiento modificado del procedimiento de Kunze et al. (Plant Cell, 16, 3496-2004). Se cortaron 3 mm cuadrados de la hoja de planta y se sumergieron en agua esterilizada durante la noche. A continuación, se transfirieron las muestras resultantes a una solución acuosa que contenía una solución tratada térmicamente ácida de cada una de las siguientes células bacterianas (1. *Corynebacterium*, 2. *E. coli*, 3. *Bacillus*, 4. *Pantoea*, 5. *Saccharomyces cerevisiae*) para generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se añadió la solución acuosa a una solución de reacción (tampón fosfato 50 mM (pH 5,8), Amplex Red 5 µM (Invitrogen), 1 µg/ml de peroxidasa de rábano picante (Sigma Aldrich PBS 15) y se llevó a cabo la medida a una excitación de 544 nm y emisión de 590 nm. Se realizó cada experimento por medio de al menos cuatro repeticiones y se estimó de acuerdo con los siguientes criterios:

60

65

Procedimiento para la estimación

1) en cada experimento, cuando se incrementó el valor medio no menos de 5 veces en comparación con el control, se asignó una puntuación de +2, y cuando se incrementó el valor medio no menos de 2 veces en comparación con el control, se asignó una puntuación de +1;

2) en cada experimento se llevó a cabo una prueba significativa, y cuando el valor de p fue < 0,01, se asignó una puntuación de +2, y cuando el valor de p fue < 0,05, se asignó una puntuación de +1;

3) la suma se dividió entre el número de experimentos, y un resultado de no menos de 1 se indicó como "++" y un resultado de no menos de 0,5 se indicó como "+"

Como se muestra en la Tabla 2, se confirmó la generación de oxígeno reactivo en varias plantas. Por lo tanto, se consideró que la inducción de la resistencia a la enfermedad por el tratamiento de solución tratada térmicamente ácida de células bacterianas no era específica de especies.

La Tabla 2 muestra los resultados de la medida de la generación del oxígeno reactivo del espécimen de hoja por la solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium glutamicum* (1), *E. coli* (2), *Bacillus subtilis* (3), *Pantoea ananatis* (4) y *Saccharomyces cerevisiae* (5). Además, "n.d." quiere decir "no determinado".

Tabla 2

Nombre científico	Nombre japonés	1	2	3	4	5
<i>Spinacia oleracea</i>	Hourensou	+	++	+	+	+
<i>Brassica rapa var. peruviridis</i>	Komatsuna	++	++	+	-	-
<i>Raphanus sativus</i>	Daikon	++	++	++	-	++
<i>Brassica oleracea var. capitata</i>	Kyabelu	++	++	++	-	n.d
<i>Brassica rapa var. chinensis</i>	Chingensai	++	++	++	+	++
<i>Brassica rapa var. glabra Regel</i>	Hakusai	++	++	-	-	+
<i>Brassica rapa var. nippo-oleifera</i>	Nanohana	++	++	-	-	-
<i>Zoysia japonica</i>	Shiba	+	++	++	++	n.d
<i>Orvza sativa</i>	Inc	++	++	++	++	++
<i>Zea mays</i>	Toumorokoshi	-	+	++	++	++
<i>Triticum aestivum</i>	Komugi	+	++	+	++	++
<i>Cucumis sativus</i>	Kyuri	++	+	++	++	++
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Syungiku	++	++	++	-	n.d
<i>Lactuca sativa</i>	Retasu	++	++	++	++	++
<i>Carthamus tinctorius</i>	Benibana	-	++	++	++	++
<i>Allium cepa</i>	Tamanegi	++	++	++	+	++
<i>Pisum sativum</i>	Endou	+	++	-	-	-
<i>Glycine max</i>	Daizu	++	++	+	+	++
<i>Vicia faba</i>	Soramame	++	++	++	++	++
<i>Allium fistulosum</i>	Negi	++	++	++	+	++

Ejemplo 6. Evaluación de la inducción de la resistencia a la enfermedad por la producción de oxígeno reactivo como índice en espárrago, fresas y uvas

Se llevó a cabo la medida de oxígeno reactivo básicamente por el procedimiento descrito en el Ejemplo 5. Para el espárrago, se recogieron las hojas de las plantas cultivadas por el procedimiento descrito en el Ejemplo 5 durante un mes y se midió la generación de oxígeno reactivo. Para fresas y uvas, se adquirieron plantas jóvenes y se aclimataron por cultivo durante de 2 a 3 semanas a 25 °C en un invernadero. A continuación, se seleccionaron y se recogieron hojas sanas y se midió la generación de oxígeno reactivo. Para la solución de tratamiento se usó una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* fraccionada para tener un peso molecular de no menos de 5 kDa y no más de 30 kDa por ultrafiltración. En la ultrafiltración, se usó un filtro de ultrafiltración (filtro de centrifuga Amicon Ultra-15, 30KNMWL, 5KNMWL; Millipore) para el fraccionamiento de peso molecular. Se llevó a cabo la medida usando la intensidad de fluorescencia relativa como cantidad generada de oxígeno reactivo que se comparó con el control. Como se muestra en la Figura 14, se descubrió que la solución fraccionada anterior también indujo la generación significativa de oxígeno reactivo durante el tratamiento de espárragos, fresas y uvas.

Ejemplo 7. Efecto de solución tratada de *Corynebacterium* sobre la actividad de quitinasa en coles. Se sembraron coles en tierra y se cultivaron durante 3 semanas. A continuación, se le inyectó a la primera hoja verdadera una solución tratada térmicamente ácida diluida 10 veces de *Corynebacterium*. 48 horas después, se midió la actividad de quitinasa. Se sometió el grupo de control a un tratamiento con agua. Como se muestra en la Figura 15, en

comparación con la del control, la actividad de quitinasa se incrementó significativamente al pulverizar la solución tratada térmicamente ácida de las células bacterianas.

Ejemplo 8. Efecto de la solución tratada térmicamente ácida de *Saccharomyces cerevisiae* sobre arroz

De acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, se examinaron los efectos de solución tratada térmicamente ácida de *Saccharomyces cerevisiae* sobre arroz midiendo un incremento en la actividad de glucanasa y el efecto de control de la infección. Como se muestra en la Figura 16, se descubrió que al pulverizar la solución tratada térmicamente ácida de *Saccharomyces cerevisiae* (dilución de 2 veces) se incrementó significativamente la actividad de glucanasa. Además, como se muestra en la Figura 17, se demostró que al pulverizar la solución tratada térmicamente ácida de *Saccharomyces cerevisiae* (dilución de 5 veces) se pudo controlar la infección patógena significativamente.

Ejemplo 9. Inducción de la expresión del gen de resistencia a la enfermedad por el tratamiento de raíces de arroz con solución tratada térmicamente ácida de células bacterianas

En una gradilla de puntas (Tip-Rack), se colocó una punta de 1 ml llenada con medio agar en la que el agar al 0,8 % se añadió a medio de cultivo de sal inorgánica OptMS (Tabla 1). Se sembraron en el medio semillas de arroz esterilizadas (variedad; Koshihikari). Se cortó parte de la punta (aproximadamente 20 mm y la parte inferior del fondo) para permitir que la raíz se alargue. Se llevó a cabo el cultivo durante una semana mientras que el lado cortado estaba sumergido en agua purificada para evitar el secado. Para que las plántulas de arroz crezcan en la punta, se unió una boya de espuma de estireno de 20 mm. A continuación, se hizo flotar la punta con la boya en un recipiente alimentario (C-AP Fruit 200, Chuo Kagaku Co., Ltd.) llenado con 1 l de OptMS. Se cultivó el arroz en estas condiciones otra semana y como material experimental se usó el arroz que tenía una edad foliar de 4,5 hojas verdaderas, que se había cultivado durante dos semanas en total. Se colocó una solución tratada (100 ml) en el fondo de una Technopot (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) y se hizo flotar el arroz que creció por hidroponia durante 2 semanas junto con la espuma de estireno de modo que la raíz estuviera suficientemente sumergida en la solución tratada. Como solución tratada, se usó una solución tratada térmicamente ácida de *Corynebacterium* a una concentración de un 20 %. Se ajustó el tamaño de la espuma de estireno con antelación para que se ajustara en una Technopot. Se llevó a cabo el cultivo en un incubador de plantas a temperatura constante (Koitotron, Koito Industries, Ltd) con un ciclo diurno de un periodo de luz de 16 horas y un periodo de oscuridad de 8 horas a una temperatura de 28 °C y una intensidad de luz de aproximadamente 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Quince horas después de que se tratara la raíz, se llevó a cabo el muestreo. Se usó toda la raíz como una muestra. Se extrajo el ARN total de cada muestra usando el kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Después de que el ARN total se sometiera a tratamiento de DNasa usando el conjunto de DNasa sin RNasa (QIAGEN), se llevó a cabo la transcripción inversa usando una transcriptasa inversa, el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) de un cebador oligo dT. A continuación, se realizó la PCR cuantitativa usando el ADNc monocatenario sintetizado como molde. Se llevó a cabo la PCR cuantitativa usando ABI PRISM 7500 con las condiciones de reacción de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 60 segundos. Como reactivo, se usó Power S YBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para los genes que se van a cuantificar, se usó RAc1 (código RAP, Os11g0163100) como gen constitutivo y se usó PBZ1 (código RAP, Os12g0555200) como gen relacionado con la resistencia a la enfermedad. Se usaron los siguientes cebadores para la expresión de cada gen; 5'-CCCCTTGTGTGTGACAATGG -3' (SEQ ID NO: 1) y 5'-CCCTGGGCGCATCGT-3'(SEQ ID NO: 2)(RAc1), 5'-GGAGCAGGAGAAGATGATCG-3'(SEQ ID NO: 3) y 5'-TTCTTCTCACATGCGACCAC 3'(SEQ ID NO: 4) (PBZ1). Se normalizó la cantidad de expresión de PBZ1 usando la cantidad de expresión de RAc1. Los resultados se muestran en la figura 18. Cuando se trató la raíz, se descubrió que la cantidad de expresión del gen PBZ1 se incrementó en la raíz.

Aplicabilidad industrial

Se puede obtener fácilmente un potenciador de resistencia a la enfermedad de la presente invención por tratamiento térmico en una solución ácida (tratamiento térmico ácido) de varios residuos celulares de microorganismos después de la fermentación de aminoácidos o similares, o células microbianas de un lodo orgánico. Además, puesto que se observa el efecto a una concentración baja (por ejemplo, tratamiento térmico ácido de 200 mg/l de células bacterianas en peso seco), se puede preparar fácilmente una gran cantidad por un bajo coste.

Es conocido que muchos plaguicidas tales como bactericidas actúan directamente sobre los patógenos de las plantas, y presentan efectos bactericidas frente a los patógenos. Sin embargo, su uso continuo a menudo provoca la emergencia de un mutante con resistencia al agente plaguicida. Por el contrario, se pueden usar plaguicidas que inducen resistencia durante un largo periodo de tiempo con menor posibilidad de emergencia de un mutante con resistencia a fármacos. La solución tratada térmicamente ácida de células microbianas previene la infección de patógenos induciendo resistencia a la enfermedad en lugar de actividad antibacteriana, y por tanto existe menos posibilidad de generar un mutante con resistencia y se puede usar durante un periodo de tiempo largo, lo que significa que el potenciador de resistencia a la enfermedad de la presente invención es industrialmente muy útil.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Ajinomoto Co., Inc.	
	< 120> POTENCIADOR DE RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD PARA PLANTAS y PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE UNA ENFERMEDAD DE PLANTA USANDO EL MISMO	
10	<130> C983-C8361	
	<150> JP2008-004833	
	<151> 11/01/2008	
15	<150> JP2008-221563	
	<151> 29/08/2008	
	<160> 4	
20	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
30	<400> 1 ccccttggtg gtagcaatgg	20
	<210> 2	
	<211> 15	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
40	<400> 2 ccctgggagc atcgt	15
	<210> 3	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 3 ggagcaggag aagatgatcg	20
	<210> 4	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> cebador	
	<400> 4 ttctctcac atgcgaccac	20
65		

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una composición que comprende un extracto de célula microbiana, en el que dicho extracto es obtenible por tratamiento térmico de células de un microorganismo en una solución ácida, como potenciador de resistencia a la enfermedad para plantas.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento térmico en una solución ácida es un tratamiento térmico a 70 °C o mayor en una solución que tiene un pH de 6 o menos.
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en bacterias Escherichia, bacterias Corineformes, bacterias Pantoea, bacterias Bacillus, levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas.
- 20 4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho potenciador de resistencia a la enfermedad es un agente de pulverización foliar.
- 25 5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha composición contiene además un metal.
- 30 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho metal es cinc y/o cobre.
- 35 7. El uso de acuerdo con una cualquiera de reivindicaciones 1 a 6, en el que la solución ácida tiene un pH de 1 a 6.
- 40 8. Un procedimiento para controlar una enfermedad de planta que comprende tratar una planta con un potenciador de resistencia a la enfermedad que comprende un extracto de célula microbiana, en el que dicho extracto es obtenible por tratamiento térmico de células de un microorganismo en una solución ácida.
- 45 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho tratamiento térmico en una solución ácida es un tratamiento térmico a 70 °C o mayor en una solución que tiene un pH de 6 o menos.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en bacterias Escherichia, bacterias Corineformes, bacterias Pantoea, bacterias Bacillus, levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho potenciador de resistencia a la enfermedad es un agente de pulverización foliar.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que dicho potenciador de resistencia a la enfermedad contiene además un metal.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho es cinc y/o cobre.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en el que la solución ácida tiene un pH de 1 a 6.

Fig. 1

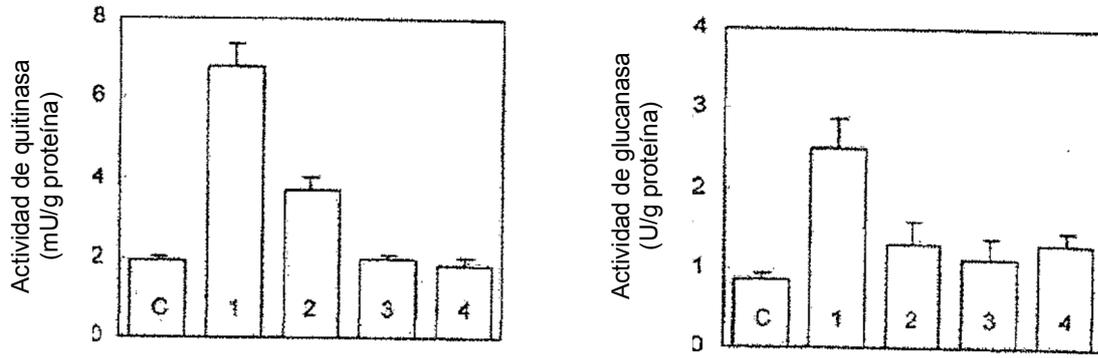


Fig. 2

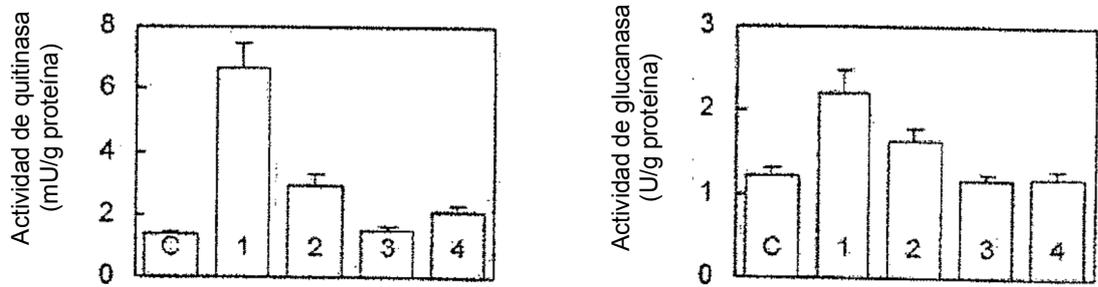


Fig. 3

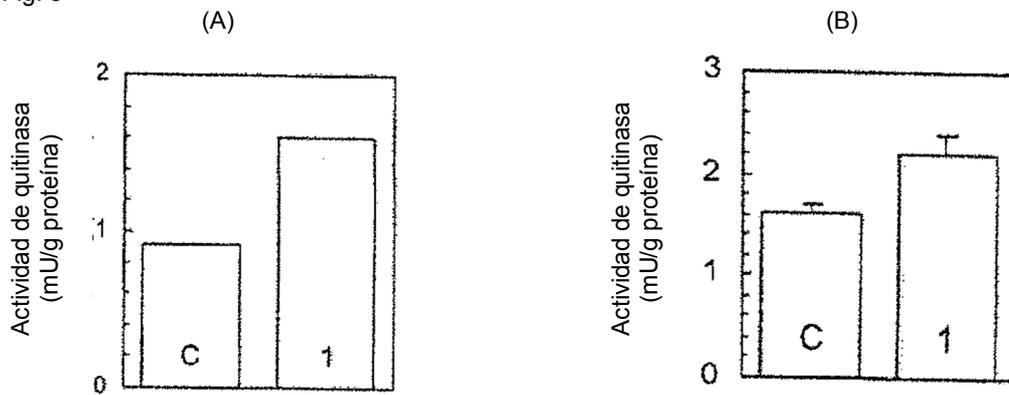


Fig. 4

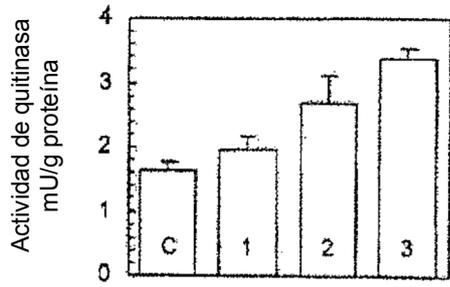


Fig. 5

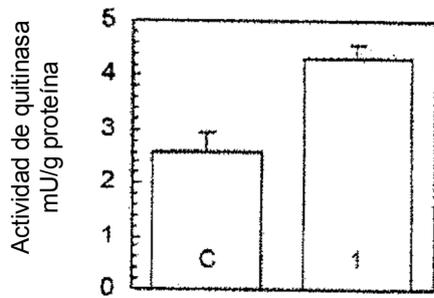
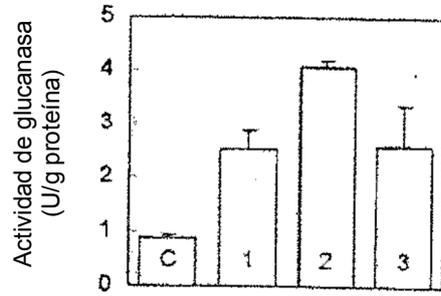
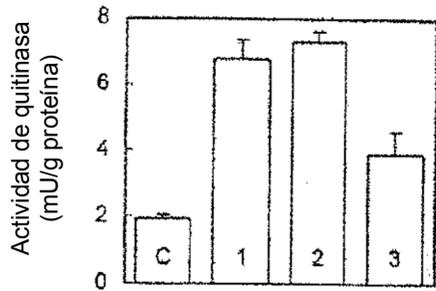


Fig. 6

24 horas después del tratamiento



72 horas después del tratamiento

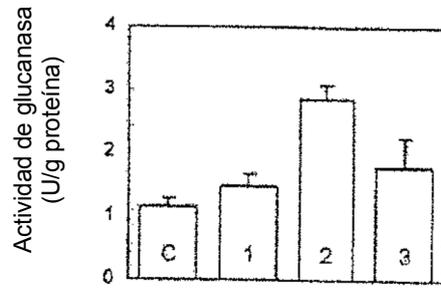
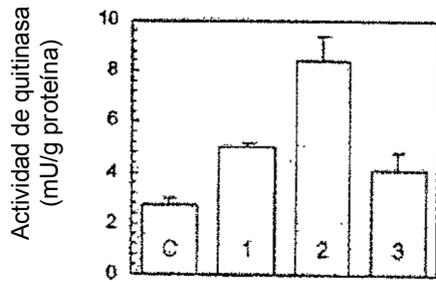


Fig. 7

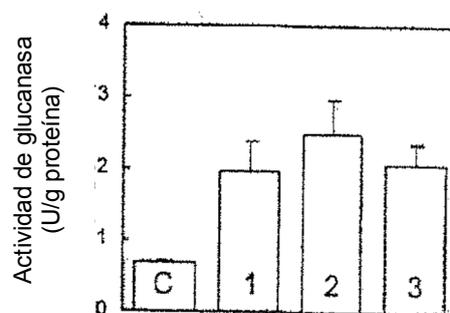
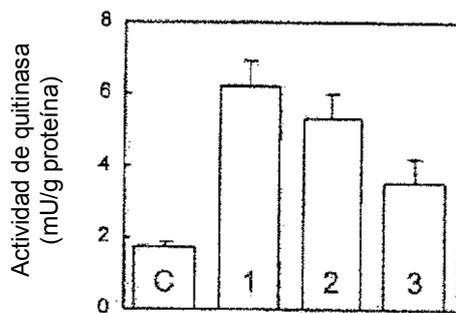


Fig. 8

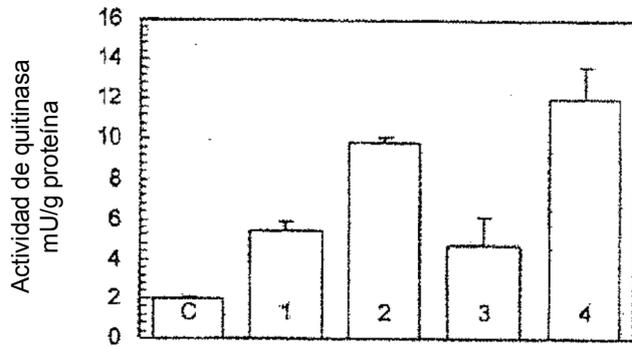


Fig. 9

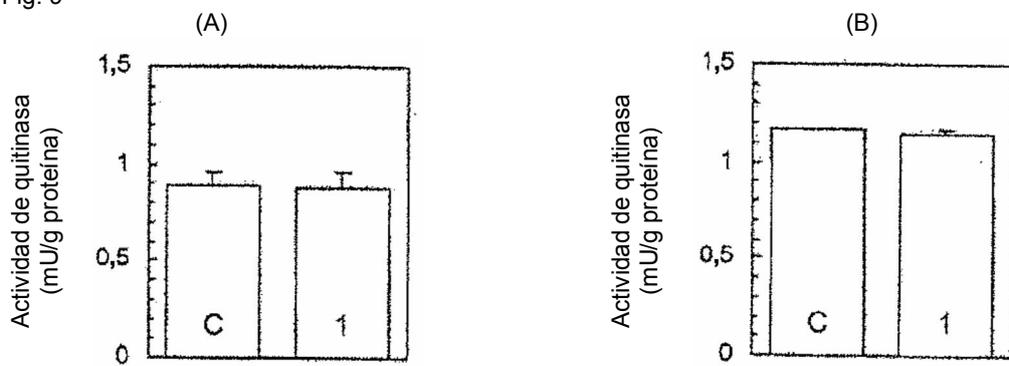


Fig. 10

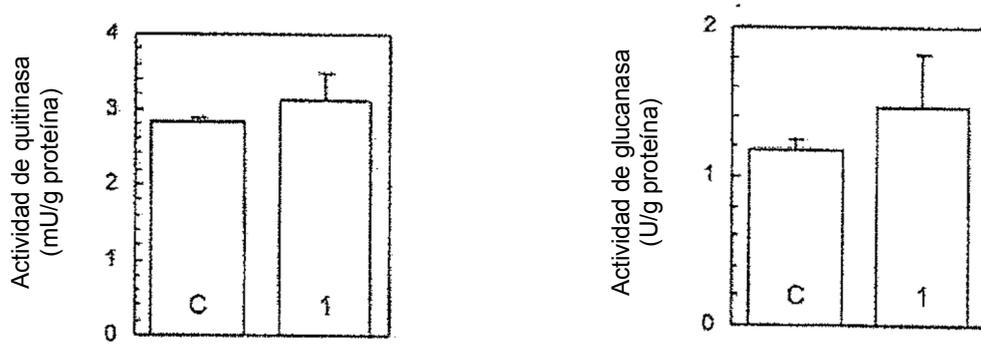
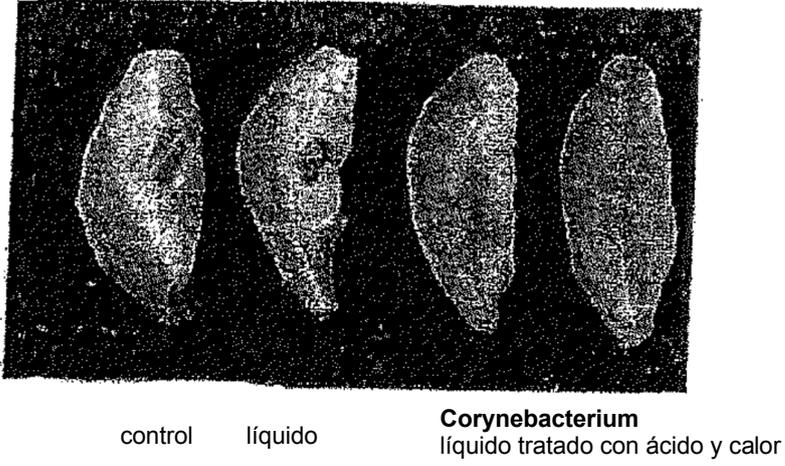


Fig. 11  
(A)



(B)

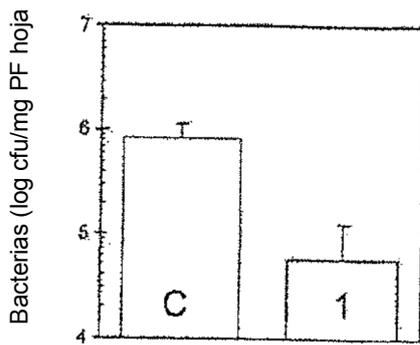


Fig. 12

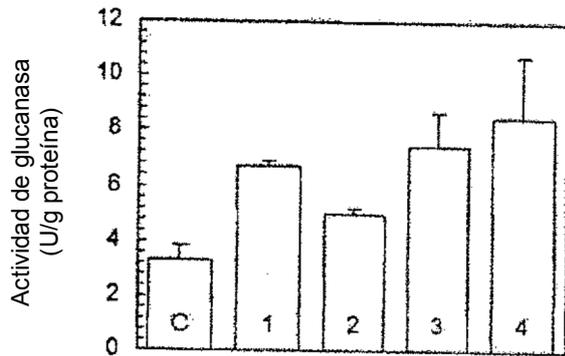


Fig. 13

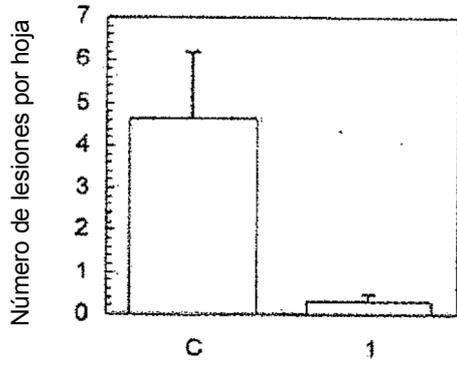


Fig. 14

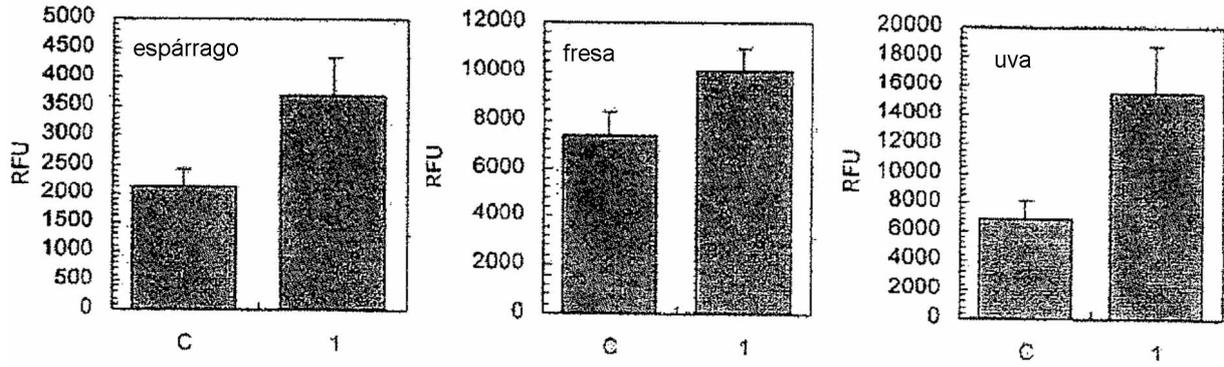


Fig. 15

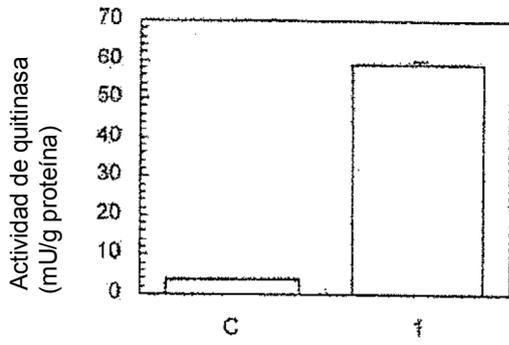


Fig. 16

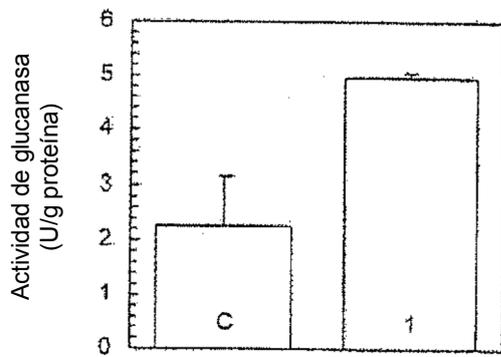


Fig. 17

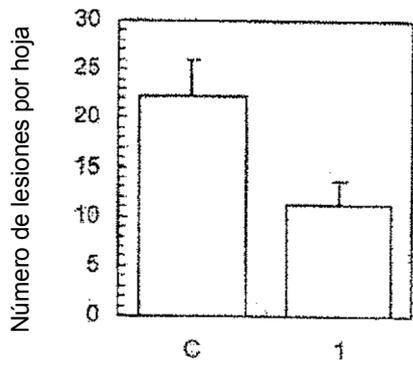


Fig. 18

