

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 905**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/44** (2006.01)

**A01G 7/06** (2006.01)

**A01N 25/00** (2006.01)

**A01N 43/36** (2006.01)

**A01P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2011 E 11732872 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2524597**

54 Título: **Uso de un agente para potenciar la resistencia a la enfermedad de la planta Cucurbitaceae y un procedimiento para controlar enfermedades de las plantas usando el agente**

30 Prioridad:

**13.01.2010 JP 2010005329**

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

**23.06.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**IGARASHI, DAISUKE y  
KADOTANI, NAOKI**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 574 905 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      Uso de un agente para potenciar la resistencia a la enfermedad de la planta *Cucurbitaceae* y un procedimiento para controlar enfermedades de las plantas usando el agente.

5      **Campo técnico**

10     La presente invención se refiere al uso de un agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae* que contiene un aminoácido como ingrediente activo, que impone menos tensión sobre el entorno, y es seguro para usuarios y consumidores, y un procedimiento para controlar una enfermedad de las plantas.

15     **Técnica anterior**

15     Para evitar las enfermedades de los cultivos agrícolas, además de los productos químicos agrícolas para evitar enfermedades actuando directamente sobre los microbios patógenos de las enfermedades de las plantas tales como fungicidas, se usan productos químicos agrícolas para controlar las enfermedades de los cultivos potenciando la resistencia a enfermedades de las propias plantas (productos químicos agrícolas de tipo inducción de resistencia). Muchos de los productos químicos agrícolas del tipo que actúan directamente sobre los microbios patógenos de las enfermedades de las plantas tales como fungicidas, muestran un efecto antimicrobiano sobre los microbios patógenos, pero el uso continuo de los mismos se presta con frecuencia a la aparición de cepas mutantes resistentes a los productos químicos agrícolas. Por otra parte, los productos químicos agrícolas del tipo inducción de resistencia no actúan directamente sobre los microbios patógenos, sino que controlan la infección de las enfermedades induciendo la resistencia de las plantas. Por lo tanto, no se ha reconocido ningún ejemplo de aparición de resistencia en cepas mutantes a los productos químicos agrícolas de este tipo. Además, puesto que los productos químicos agrícolas del tipo inducción de resistencia muestran poca acción tóxica frente a organismos, se considera que imponen comparativamente poca tensión sobre el entorno que incluye organismos distintos de las plantas.

30     Como productos químicos agrícolas que ayudan en la inducción de resistencia a enfermedades de las plantas, se han comercializado hasta ahora probenazol (nombre comercial: Oryzmate, MEILI PHARMACEUTICAL CO, LTD), un compuesto de tipo benzotiazol (BTH), acibenzolar-S-metilo (ASM, nombre comercial: Bion, Syngenta Japan, KK), y un compuesto de tipo tiadiazolcarboxamida, tiadinilo (nombre comercial: V-GET, NIHON NOHYAKU CO., LTD.).

35     Además, como sustancias derivadas de productos naturales que inducen la resistencia a enfermedades, se ha informado de productos de descomposición de polisacáridos (por ejemplo, documento de patente 1), cerebrósidos (por ejemplo, documento de patente 2), ácido jasmónico (por ejemplo, documento de patente 3), oligosacáridos de quitina (por ejemplo, documento distinto de patente 1),  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucanooligosacáridos (por ejemplo, documento distinto de patente 2), ácido biliar (documento de patente 4), peptidoglucanos (documento distinto de patente 3), lipopolisacáridos (documento distinto de patente 4), etc. Estas sustancias se llaman inductores, y se sabe que tienen efectos de acumulación de fitoalexinas que muestran actividad antimicrobiana frente a microbios patógenos, de acumulación de proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogénesis), tales como quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa, que lisan las paredes celulares de los microbios patógenos, de inducción de muerte celular hipersensible, etc. (por ejemplo, documento distinto de patente 1).

45     Además, también se divulga un procedimiento para controlar la infección de microbios patógenos rociando el sobrenadante de cultivo obtenido por fermentación de prolina usando bacterias que pertenecen al género *Corynebacterium* (documento de patente 5), y un agente para potenciar la resistencia a enfermedades para plantas que contienen un extracto obtenido por tratamiento térmico de células microbianas en una solución ácida (documento de patente 6).

50     En cuanto a los aminoácidos, se ha informado de que el ácido L-glutámico (documento distinto de patente 5) y prolina (documento distinto de patente 6) controlan o suprimen enfermedades de la planta de arroz y *Pennisetum typhoideum*, respectivamente, pero no se describen para plantas de *Cucurbitaceae*. Además, se ha informado de que los aminoácidos que contienen azufre (documentos de patente 7 y 8), ácido aminobutírico (documento de patente 7) y glicina (documento de patente 9) controlan enfermedades de las plantas o potencian la resistencia a enfermedades de las plantas, cuando se usan en combinación con un microorganismo, glucosa, o similares. Sin embargo, estos efectos no son efectos obtenidos con los aminoácidos solos. Además, aunque se ha informado de que las enfermedades de las plantas se pueden controlar por aplicación de un fertilizante mixto que contiene un aminoácido (documentos de patente 10, 11 y 12), éstos tampoco son efectos obtenidos con los aminoácidos solos, y no se basan en la inducción de resistencia a enfermedades. Además, aunque también se ha informado del control de enfermedades de las plantas usando una mezcla de aminoácidos (prolina, metionina y fenilalanina) (documento de patente 13), el efecto no es el efecto de cada tipo individual de aminoácido, y no se basa en la inducción de resistencia a la enfermedad, tampoco. Además, aunque se ha informado del control de enfermedades usando caldo de cultivo obtenido de la fermentación de lisina o ácido glutámico (documento de patente 14), no se describe ningún dato, por lo que el ingrediente activo es desconocido, y tampoco queda claro si se obtuvo el efecto por inducción de resistencia a la enfermedad o no. Además, aunque se ha informado de que el tratamiento de hojas de *Eleusine*

*coracana* con DL-fenilalanina promovió la síntesis de sustancias con fenol, e inhibió la germinación de esporas y la extensión del tubo germinativo de *Cochliobolus miyabeanus* (documento distinto de patente 8), no se describe si el tratamiento con fenilalanina realmente suprime la invasión o infección del microbio patógeno.

- 5 En cuanto a la inducción de la resistencia a las enfermedades por un aminoácido solo en el pepino, que es una planta *Cucurbitaceae*, se ha informado de que la alanina tiene un efecto de este tipo (documento distinto de patente 7). Sin embargo, no se hace referencia a otros aminoácidos.

#### Referencias de la técnica anterior

10

Documentos de patente

Documento de patente 1: Patente japonesa abierta a inspección pública (KOKAI) n.º 5-331016

- 15 Documento de patente 2: Patente japonesa n.º 2846610

Documento de patente 3: Patente japonesa abierta a inspección pública n.º 11-29412

Documento de patente 4: Patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2006-219372

20

Documento de patente 5: Patente japonesa abierta a inspección pública n.º 6-80530

Documento de patente 6: Publicación internacional WO2009/088074

- 25 Documento de patente 7: Patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2003-34607

Documento de patente 8: Patente japonesa n.º 4287515

Documento de patente 9: Patente china abierta a inspección pública n.º 1640233/A

30

Documento de patente 10: Patente china n.º 1316893C

Documento de patente 11: Patente china abierta a inspección pública n.º 1328769A

- 35 Documento de patente 12: Patente china abierta a inspección pública n.º 101182270A

Documento de patente 13: Patente china abierta a inspección pública n.º 101142925A

Documento de patente 14: Patente china n.º 1155543C

40

Documento de patente 15: Publicación internacional WO00/25582

Documentos distintos de patente

- 45 Documento distinto de patente 1: Yamada, A. *et al.*, Biosci. Biotech. Biochem., 1993, 57 (3): 405-409

Documento distinto de patente 2: Yamaguchi, T. *et al.*, Plant Cell, 2000, 12:817-826

Documento distinto de patente 3: Gust, A.A. *et al.*, J. Biol. Chem., 2007, 282:32338-32348

50

Documento distinto de patente 4: Newman, M.A. *et al.*, Plant J. 2002, 29:487-495

Documento distinto de patente 5: Voleti, S.R. *et al.*, Crop Protection, 2008, 27:1398-1402

- 55 Documento distinto de patente 6: Raj, S.N. *et al.*, Phytoparasitica, 2004, 32:523-527

Documento distinto de patente 7: Park, K.S. *et al.*, Folia Microbiol., 2009, 54:322-326

Documento distinto de patente 8: Purushothaman, D. *et al.*, Current Science, 1974, 43:47-49

60

Documento distinto de patente 9: Van Andal, O.M., Annual Review of Phytopathology, 1966, 4, 349-368

#### Sumario de la invención

- 65 Objeto que se va a lograr por la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un uso de un agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta, que es seguro para usuarios y consumidores, y económico, y un procedimiento para controlar una enfermedad de una planta usando el mismo.

5 Medios para lograr el objetivo

Los inventores de la presente invención buscaron sustancias inductoras de resistencia a enfermedades de las plantas, y descubrieron que los aminoácidos tenían una actividad de inducción de resistencia a la enfermedad alta. En particular, descubrieron que, cuando se aplicó ácido glutámico, treonina, serina o prolina a las plantas, se observó un incremento de la actividad quitinasa, que es un índice de actividad de inducción de resistencia a la enfermedad, y se proporcionó una inducción de resistencia a la enfermedad marcada. Y confirmaron que los tratamientos con estos aminoácidos proporcionaron un efecto de control de enfermedad alto para dichas enfermedades como el moho pulverulento del pepino y la antracnosis del pepino, y lograron la presente invención.

15 Esto es, la presente invención se realiza como sigue.

1. Uso de ácido glutámico y treonina en un agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae*.

20 2. El uso de acuerdo con el punto 1, en el que el agente contiene ácido glutámico en de 5 mM a 100 mM, y contiene además treonina en de 2 mM a 100 mM.

3. El uso de acuerdo con el punto 1 o 2, en el que el agente contiene ácido glutámico en de 5 a 50 mM, y contiene además treonina en de 2 a 50 mM.

25 4. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que la planta *Cucurbitaceae* es pepino, melón, calabaza o sandía.

30 5. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que la enfermedad es moho pulverulento del pepino o antracnosis del pepino.

6. Uso de ácido glutámico y alanina en un agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae*, en el que el agente comprende ácido glutámico en de 5 mM a 100 mM, y contiene además alanina en de 2 mM a 100 mM.

35 7. El uso de acuerdo con el punto 6, en el que el agente contiene ácido glutámico en de 5 mM a 50 mM, y contiene además alanina en de 2 mM a 50 mM.

40 8. El uso de acuerdo con el punto 6 o 7, en el que la planta de *Cucurbitaceae* es pepino, melón, calabaza o sandía.

9. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 6 a 8, en el que la enfermedad es moho pulverulento del pepino o antracnosis del pepino.

45 10. Un procedimiento para controlar una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae*, que comprende tratar la planta *Cucurbitaceae* con el agente de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 5.

11. Un procedimiento para controlar una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae*, que comprende tratar la planta *Cucurbitaceae* con el agente de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 6 a 9.

50

**Breve descripción de los dibujos**

La fig. 1 muestra los efectos de inducción de resistencia a la enfermedad de aminoácidos proporcionados en los cotiledones del pepino por aplicación foliar.

55 La fig. 2 muestra los efectos de inducción de resistencia a la enfermedad de aminoácidos proporcionados en las hojas verdaderas del pepino por aplicación foliar.

60 La fig. 3 muestra los efectos de inducción de resistencia a la enfermedad de aminoácidos proporcionados en la calabaza por aplicación foliar.

La fig. 4 muestra los efectos de inducción de resistencia a la enfermedad de aminoácidos proporcionados en el melón por aplicación foliar.

65 La fig. 5 muestra los efectos de inducción de resistencia a la enfermedad de aminoácidos proporcionados en la sandía por aplicación foliar.

La fig. 6 muestra los efectos de inducción de resistencia a la enfermedad de soluciones mixtas de aminoácidos proporcionadas en los cotiledones del pepino por aplicación foliar.

5 La fig. 7 muestra los efectos de control del moho pulverulento del pepino de aminoácidos proporcionados por aplicación foliar.

La fig. 8 muestra los efectos de control de la antracnosis del pepino de aminoácidos proporcionados por aplicación foliar.

10 La fig. 9 muestra el efecto de control de la antracnosis del pepino de un aminoácido proporcionado por aplicación a la rizosfera.

### 15 **Modos de realización para llevar a cabo la invención**

A continuación en el presente documento, la presente invención se explicará en detalle.

20 El agente usado para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae* en la presente invención contiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, treonina, serina y prolina como ingrediente activo en el que el agente contiene al menos ácido glutámico y treonina o ácido glutámico en de 5 mM a 100 mM y alanina en de 2 mM a 100 mM.

25 Cuando el agente para potenciar la resistencia a una enfermedad contiene ácido glutámico, el agente contiene además treonina y/o alanina.

El aminoácido puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido, o una mezcla de L- y D-aminoácidos que los contiene en una proporción arbitraria, pero el aminoácido es preferentemente un L-aminoácido.

30 El aminoácido es una mezcla de ácido glutámico y treonina, o ácido glutámico y alanina. El aminoácido puede contener un aminoácido distinto de estos aminoácidos, pero es preferente que el aminoácido no contenga ningún aminoácido distinto de estos aminoácidos.

35 El ácido glutámico puede estar en forma libre, o puede estar en forma de sal, tal como sal de amonio, sal de sodio y sal de potasio.

40 La forma del aminoácido no está particularmente limitada siempre que contenga los aminoácidos, y puede ser cualquiera de los reactivos generalmente vendidos, productos purificados o productos casi purificados producidos por fermentación, y composiciones que contienen los aminoácidos, tales como extractos de productos marinos e hidrolizados de proteínas.

45 Como se demuestra en los ejemplos, si el ácido glutámico, treonina, serina o prolina se aplica a una planta *Cucurbitaceae*, se incrementa la actividad quitinasa en un tejido de la planta tal como hojas. Además, la acción de incremento de la actividad quitinasa de ácido glutámico se potencia adicionalmente cuando se combina con treonina y/o alanina.

50 La resistencia a enfermedades de las plantas se potencia por una serie de reacciones representadas por la producción de especies activas de oxígeno, la acumulación de proteínas antimicrobianas y compuestos antimicrobianos, el fortalecimiento de las paredes celulares, y la acumulación de enzimas antimicrobianas tales como quitinasa y glucanasa, que a menudo se provocan en las plantas en el momento de la infección con bacterias, hongos filamentosos, etc., para evitar la expansión de la infección. Se sabe que existe una correlación entre la actividad quitinasa y la potenciación de la resistencia a enfermedades. Por ejemplo, Irving, H. *et al.* describieron que cuando se aplicó  $K_2HPO_4$  al pepino por aplicación foliar, se indujo resistencia adquirida sistémica (SAR), y de este modo se pudo suprimir la antracnosis del pepino, y usaron el incremento de la actividad quitinasa como un índice de SAR (Physiological and Molecular Plant Pathology, 1990, 37: 355-366). Además, Schlumbaum, A. *et al.* también informaron de que la actividad de la enzima antimicrobiana, quitinasa, se incrementó en plantas leguminosas como respuesta a la infección por microbios patógenos (Nature, 1986, 324: 365-367).

60 Como se demuestra en los ejemplos, se confirmó que la aplicación independiente de ácido glutámico o serina, o la aplicación mixta de ácido glutámico y alanina potenció la resistencia a la antracnosis del pepino y al moho pulverulento del pepino, y que la aplicación de ácido glutámico, treonina o serina potenció la resistencia a la antracnosis del melón, y por tanto, se confirmó la correlación de la actividad quitinasa y la potenciación de la resistencia a enfermedades. Por lo tanto, se considera que la prolina, que se confirmó que tenía una actividad de incremento de la actividad quitinasa de una planta, también tiene una acción de potenciación de la resistencia a enfermedades.

65 El agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta puede contener componentes arbitrarios

además del aminoácido. Los ejemplos de los componentes incluyen componentes tales como disolvente, vehículo, agente de ajuste de pH, agente de propagación para potenciar el poder de propagación en los cuerpos de las plantas, tensioactivo para potenciar la permeabilidad de las plantas, componente fertilizante para potenciar el efecto fertilizante tal como minerales, componente agroquímico, aglutinante, carga, etc. Como estos componentes, se pueden usar componentes usados normalmente para los productos químicos agrícolas, fertilizantes, etc., siempre que no se degrade el efecto de la presente invención.

Los ejemplos del disolvente incluyen agua, alcoholes, etc. Los ejemplos del vehículo incluyen vehículos de tipo mineral y vehículos de tipo vegetal tales como carbonato de calcio, tierra de diatomeas y perlita.

Como se describe anteriormente, el agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta puede ser una composición que contiene un aminoácido y otros componentes, es decir, una composición para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta. Sin embargo, el agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta puede consistir sólo en el aminoácido.

Además, el agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta en forma de sólido o polvo se puede disolver o dispersar en un disolvente tal como agua en el momento de uso.

El contenido del aminoácido en el agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta no está limitado en particular, y se puede determinar adecuadamente de acuerdo con la cantidad de aplicación descrita a continuación. Por ejemplo, aunque el contenido del aminoácido en el agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta no está particularmente limitado siempre que se pueda aplicar el aminoácido en una cantidad eficaz para la potenciación de la resistencia a la enfermedad, es, por ejemplo, normalmente de 1 a 200 mM, preferentemente de 2 a 100 mM, cuando el agente contiene un solo tipo de aminoácido. Cuando el agente contiene dos o más tipos de aminoácidos, el contenido de cada aminoácido es normalmente de 1 a 200 mM, preferentemente de 2 a 100 mM. Además, cuando se usa ácido glutámico en combinación con alanina y/o treonina, el agente contiene preferentemente ácido glutámico en de 0,2 a 100 mM, más preferentemente de 1 a 50 mM, y uno o ambos de alanina y treonina en de 0,2 a 100 mM, más preferentemente de 1 a 50 mM, individualmente o en ambos. Cuando el agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta está en forma de sólido o polvo, la concentración descrita anteriormente es una concentración de una solución preparada con el agente en el momento de uso.

La planta *Cucurbitaceae* como objetivo de la aplicación del agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta no está particularmente limitada, y los ejemplos incluyen pepino, melón, calabaza, sandía, etc.

Puesto que las respuestas a la resistencia a la enfermedad generales son inespecíficas para microbios patógenos, la enfermedad objetivo no está particularmente limitada, y los ejemplos incluyen, por ejemplo, enfermedades de las plantas provocadas por hongos filamentosos, bacterias y virus. Los ejemplos típicos de enfermedades de las plantas *Cucurbitaceae* incluyen marchitado bacteriano del pepino, moho pulverulento del pepino, mancha marrón bacteriana del pepino, tizón de la hoja del pepino, antracnosis del pepino, tizón del tallo gomoso del pepino, marchitado por *Fusarium* del pepino, caída del pepino, podredumbre blanda bacteriana del pepino, podredumbre de la raíz del pepino, moho gris del pepino, moho veloso del pepino, marchitado bacteriano del melón, moho pulverulento del melón, mancha marrón bacteriana del melón, tizón de la hoja del melón, antracnosis del melón, tizón del tallo gomoso del melón, enfermedad por *Fusarium* del melón, caída del melón, melón podredumbre blanda bacteriana del melón, podredumbre de la raíz del melón, moho gris del melón, moho veloso del melón, etc. Entre estos, el agente de la presente invención es especialmente eficaz contra el moho pulverulento del pepino y la antracnosis del pepino. Los ejemplos de los microbios patógenos de estas enfermedades incluyen hongo del moho pulverulento del pepino (*Erysiphe polygoni*), hongo de la antracnosis del pepino (*Colletotrichum orbiculare* (*syn.* *C. orbiculare*), etc.

Al aplicar el agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae*, se puede potenciar la resistencia a dichas enfermedades como se describe anteriormente. Aunque el procedimiento de aplicación no está particularmente limitado, los ejemplos incluyen, por ejemplo, rociado sobre el cuerpo de la planta, rociado en la rizosfera, tal como rociado en la superficie del suelo, irrigación o mezcla en el suelo, aplicación al cuerpo de la planta e inmersión de la raíz. Entre estos, es preferente el rociado en el cuerpo de la planta, por ejemplo, rociado en la superficie de la hoja (aplicación foliar). Además, cuando el agente para potenciar la resistencia a una enfermedad contiene ácido glutámico, también es preferente el rociado en la rizosfera.

El procedimiento para controlar una enfermedad de las plantas de la presente invención principalmente ayuda en la profilaxis de la enfermedad, y es preferente usarlo en una fase anterior al brote de la enfermedad. Sin embargo, cuando se aplica incluso después del brote de una enfermedad, se puede esperar el efecto de supresión de la expansión de la enfermedad, o disminución de la enfermedad.

La cantidad de aplicación del agente para potenciar la resistencia a una enfermedad puede variar dependiendo de la concentración del ingrediente activo, fase de aplicación, número de veces de aplicación, tipo de planta, densidad de cultivo, fase de crecimiento, procedimiento de aplicación, etc. En el caso de aplicación foliar, la cantidad de aplicación es, por ejemplo, normalmente de 100 a 5000 l/hectárea a una concentración de 1 a 200 mM,

preferentemente de 500 a 1000 l/hectárea a una concentración de 2 a 200 mM, cuando se contiene ácido glutámico, treonina, serina o prolina en el agente, o normalmente de 100 a 5000 l/hectárea a una concentración de 0,4 a 200 mM, preferentemente de 500 a 1000 l/hectárea a una concentración de 2 a 200 mM, en términos de cantidad total, cuando se usan ácido glutámico y treonina, o ácido glutámico y alanina en combinación. Cuando se usan ácido glutámico y treonina en combinación, la proporción de cantidad (proporción molar) de ácido glutámico y treonina es normalmente de 10:1 a 1:2, preferentemente de 5:1 a 1:1. Cuando se usan ácido glutámico y alanina en combinación, la proporción de cantidad (proporción molar) de ácido glutámico y alanina es normalmente de 10:1 a 1:2, preferentemente de 5:1 a 1:1. Cuando se usan ácido glutámico, treonina y alanina en combinación, se pueden aplicar en cantidades similares a las cantidades de aplicación mencionadas anteriormente. Además, cuando se aplica ácido glutámico a la rizosfera, la cantidad de aplicación puede ser la misma que la cantidad mencionada anteriormente para la aplicación foliar de ácido glutámico solo. El número de veces de la aplicación puede ser uno, o dos o más, y se puede determinar apropiadamente dependiendo del brote de una enfermedad o síntoma de la misma.

## 15 Ejemplos

A continuación en el presente documento, la presente invención se explica aún más específicamente con referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada por estos ejemplos. Los aminoácidos usados en los siguientes ejemplos son L-aminoácidos.

20 Ejemplo 1: Evaluación de la inducción de resistencia a enfermedades de las plantas n base a la actividad enzimática

### (1) Procedimientos para el cultivo de plantas y rociado

25 Se evaluó la inducción de resistencia a enfermedades de las plantas en el pepino usando cotiledones y las primeras hojas verdaderas. Para la evaluación usando cotiledones, se usaron plantas de pepino (variedad: "Tokiwa jibai") cultivadas durante una semana después de la siembra en abono para horticultura (Power Soil, Kureha Chemical Industry Co., Ltd.). Para la evaluación usando hojas verdaderas, se usaron plantas de pepino (variedad: "Yotsuba") cultivadas durante dos semanas después de la siembra en abono para horticultura (Power Soil, Kureha Chemical Industry Co., Ltd.).

30 Se realizó una evaluación para calabaza, melón y sandía usando las primeras hojas verdaderas de plantas de calabaza (variedad "Hokkorihime"), melón (variedad: "Lenon") y sandía (variedad: "Benikodama") cultivadas durante dos semanas después de la siembra en abono para horticultura (Power Soil, Kureha Chemical Industry Co., Ltd.).

35 Se cultivaron las plantas en una cámara de cultivo a una temperatura de 23 a 25°C con periodicidad diurna de período de luz de 14 horas a una intensidad de luz de aproximadamente 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Para la aplicación foliar de costumbre, se añadió Approach BI (Kao Corp., "Approach BI" es una marca comercial registrada de Kao Corp.) a una concentración 1/1000 como agente de propagación. Para el tratamiento de los cotiledones, se dejó gotear cada solución de prueba sobre los cotiledones en 25 lugares en un volumen de 2  $\mu\text{l}$  cada una, y se recogieron las regiones goteadas como muestras para la medida de la actividad enzimática. Para el tratamiento de las hojas verdaderas, se pulverizó cada solución de prueba en un volumen de aproximadamente 1 ml/100  $\text{cm}^2$  con un pulverizador, y se recogieron muestras de 2 cm cuadrados en el centro de las hojas como muestras para la medida de la actividad enzimática.

### 45 (2) Extracción de la enzima

Inmediatamente después de la recogida mencionada anteriormente de las muestras para la medida de la actividad enzimática, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Se trituró cada muestra en estado congelado con una trituradora de plantas MM300 MIXER MILL GRINDER (Retsch), y se suspendió en 300  $\mu\text{l}$  de un tampón de extracción [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM / $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,0), DTT 1 mM, inhibidor de proteasas cOplete, mini, EDTA-free (Roche)]. Se centrifugó la suspensión a 10.000 rpm durante 5 minutos, y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para retirar la materia insoluble. Se usó la fracción obtenida como fracción de extracto bruto, de la que se midió la concentración de proteínas por el procedimiento de Bradford, para la medida de la actividad enzimática.

### 55 (3) Medida de la actividad quitinasa

60 Se midió la actividad quitinasa por el procedimiento de McCreath *et al.* (McCreath, K. *et al.*, J. Microbiol. Methods, 1992, 14:229-237). Se disolvió el sustrato, 4MU-(GlcNAc)<sub>3</sub> (4-metilumbeliferil- $\beta$ -d-N,N',N"- triacetilquitobiosa, SIGMA M5639) en etanol al 50 % a una concentración final de 0,4 mM, y se almacenó a -20 °C. Se diluyó esta solución madre de sustrato 10 veces en el momento de uso, y se usó como solución de sustrato. Se ajustó la fracción de extracto en bruto mencionada anteriormente a una concentración de proteínas de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se preincubó cada muestra (50  $\mu\text{l}$ ) a 37 °C durante 10 minutos en una placa de 96 pocillos, y a continuación se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de la solución de sustrato a la muestra para iniciar la reacción a 37 °C.

Treinta minutos y 90 minutos después del inicio de la reacción en el experimento usando cotiledones de pepino, 90 minutos y 120 minutos después del inicio de la reacción en los experimentos usando las hojas verdaderas de pepino, calabaza y melón, o 60 minutos y 120 minutos después del inicio de la reacción en el experimento usando las hojas verdaderas de sandía, se añadieron 100 µl de tampón Gly 1 M/NaOH (pH 10,2) a la mezcla de reacción para terminar la reacción. Se lograron la reacción y la terminación de la reacción en la placa de 96 pocillos en un volumen de reacción final de 200 µl. Después de retirar completamente las burbujas en la superficie de la mezcla de reacción, se midió la intensidad de fluorescencia usando un lector de placas para detección de fluorescencia, SpectraMax M2 (Molecular Devices). En esta fluorometría, se realizó la medida a 360 nm (excitación) y 450 nm (emisión). En base al valor estándar calculado usando 4MU (4-metilumbeliferona) como sustancia estándar, se definió la cantidad de la enzima que cataliza la reacción para 1 µmol del sustrato por 1 minuto como 1 unidad.

#### (4) Resultados

Las soluciones de un solo tipo de aminoácido a una concentración 100 mM para varios aminoácidos se aplicaron cada una a cotiledones de pepino, y se midió la actividad enzimática después de 48 horas. Los resultados se muestran en la fig. 1. Los valores del promedio y DE para los resultados de los experimentos llevados a cabo por triplicado se muestran en la fig. 1. Se descubrió que el glutamato de sodio (en adelante denominado "ácido glutámico"), serina y prolina tuvieron un efecto de incremento de la actividad quitinasa, que es un marcador de inducción de resistencia a la enfermedad.

Se aplicaron las soluciones de un solo tipo de aminoácido a una concentración 20 mM para varios aminoácidos a hojas verdaderas de pepino como cada solución o una mezcla de las soluciones, y se midió la actividad de la enzima después de 48 horas. Los resultados se muestran en la fig. 2. Los valores del promedio y DE para los resultados de los experimentos llevados a cabo por triplicado se muestran en la fig. 1. Se descubrió que la treonina tuvo un efecto de incremento de la actividad quitinasa, que es un marcador de inducción de resistencia a la enfermedad. También se descubrió que se potenció la actividad añadiendo alanina o treonina a ácido glutámico.

Las soluciones de un solo tipo de aminoácido a una concentración 20 mM para varios aminoácidos se aplicaron cada una a hojas verdaderas de calabaza, melón y sandía, y se midió la actividad de la enzima después de 48 horas. Los resultados se muestran en las figs. 3, 4 y 5, respectivamente. Los valores del promedio y DE para los resultados de los experimentos llevados a cabo por triplicado se muestran en las figs. 3, 4 y 5. Se descubrió que el ácido glutámico, treonina, serina y prolina tuvieron un efecto de incremento de la actividad quitinasa, que es un marcador de inducción de resistencia a la enfermedad.

Las soluciones mezcladas de ácido glutámico (5 mM o 10 mM) y alanina o treonina (2 mM o 5 mM) se aplicaron cada una a cotiledones de pepino, y se midió la actividad de la enzima después de 48 horas. Los resultados se muestran en la fig. 6. Los valores del promedio para los resultados de los experimentos llevados a cabo por duplicado se indican con barras, y los valores para cada resultado se indican con círculos. Mientras que apenas se observó el efecto con ácido glutámico solo a las concentraciones mencionadas anteriormente, el efecto se observó claramente con las soluciones mezcladas que contienen además alanina o treonina (2 mM o 5 mM).

#### Ejemplo 2: Efecto de controlar el moho pulverulento del pepino y la antracnosis del pepino

##### (1) Procedimientos para el cultivo de plantas y rociado

Para el experimento, se usaron plantas de pepino (variedad: "Yotsuba") cultivadas durante dos semanas después de la siembra en abono para horticultura (Power Soil, Kureha Chemical Industry Co., Ltd.). Se cultivaron las plantas en una cámara de cultivo a una temperatura de 23 a 25 °C con periodicidad diurna de período de luz de 14 horas a una intensidad de luz de aproximadamente 100 µmol/m<sup>2</sup>/s. Cuarenta y ocho horas después de la aplicación foliar de cada solución de muestra, se inoculó cada uno de los microbios patógenos descritos a continuación por pulverización. A la solución para rociado, se le añadió Approach BI (Kao Corp.) en una cantidad 1/1000.

##### (2) Evaluación para el control de moho pulverulento del pepino

Se aisló el hongo del moho pulverulento del pepino (*Sphaerotheca fuliginea*) de una superficie de una hoja crecida de forma natural en un campo. Se mantuvo el microbio patógeno obtenido por infección en una planta el día 11 después de la siembra cada 2 semanas en una incubadora termostregulada a 23-25 °C, y se usó en el siguiente experimento.

Las soluciones de ácido glutámico 50 mM o 20 mM, serina 20 mM y alanina 20 mM, y una solución mezclada de ácido glutámico 20 mM y alanina 20 mM se rociaron cada una sobre las primeras hojas verdaderas de plantas de pepino dos semanas después de la siembra, y 48 horas después del rociado, se inoculó el hongo del moho pulverulento del pepino (*Erysiphe polygoni*). Se realizó la inoculación pulverizando una suspensión de conidios (2 x 10<sup>5</sup> conidios/ml) sobre las superficies de las hojas. Se realizó la evaluación contando el número de colonias que surgieron en cada hoja tratada 10 días después de la inoculación. Los resultados se muestran en la fig. 7. Se muestran los valores de promedio y DE de los resultados de los experimentos llevados a cabo por triplicado a

sextuplicado. Se demostró que, en comparación con el resultado del control, la infección del microbio patógeno se pudo suprimir significativamente por la aplicación foliar de ácido glutámico, serina y la solución mezclada de ácido glutámico y alanina. Por otra parte, también se demostró que la infección del microbio patógeno no se pudo controlar por la aplicación foliar de alanina.

5

### (3) Evaluación del control de la antracnosis del pepino

Una solución de ácido glutámico 50 mM, una solución mezclada de ácido glutámico 20 mM y alanina 20 mM, y soluciones de ácido glutámico 20 mM, serina 20 mM, y treonina 20 mM se pulverizaron cada una sobre las primeras hojas verdaderas de plantas de pepino dos semanas después de la siembra, y 48 horas después de la pulverización, se inoculó el hongo de antracnosis de la planta *Cucurbitaceae* (*Colletotrichum lagenarium* (syn: *C. orbiculare*). Se realizó la inoculación pulverizando una suspensión de conidios ( $1 \times 10^5$  conidios/ml) sobre las superficies de las hojas. Después de la inoculación por pulverización, se infectó el hongo de antracnosis de la planta *Cucurbitaceae* en las plantas, dejando las plantas inoculadas colocadas en un lugar oscuro y húmedo durante 24 horas. Se realizó la evaluación contando el número de lesiones patológicas que surgieron en cada hoja tratada 7 días después de la inoculación. Los resultados se muestran en la fig. 8. Se muestran los valores de promedio y DE de cada experimento llevado a cabo por triplicado. Como se muestra en la fig. 8, se demostró que, en comparación con el resultado del control, la infección del microbio patógeno se pudo suprimir significativamente por la aplicación foliar de ácido glutámico, una solución mezclada de ácido glutámico y alanina, serina, o treonina.

20

### Ejemplo 3: Efecto de control de la antracnosis del melón (1)

#### Procedimientos para el cultivo de plantas y rociado

Para el experimento, se usaron plantas de melón (variedad: "Lenon") cultivadas durante dos semanas después de la siembra en abono para horticultura (Power Soil, Kureha Chemical Industry Co., Ltd.). Se cultivaron las plantas en una cámara de cultivo a una temperatura de 23 a 25 °C con periodicidad diurna de período de luz de 14 horas a una intensidad de luz de aproximadamente 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Cuarenta y ocho horas después de la aplicación foliar de cada solución de muestra, se inoculó el microbio patógeno descrito a continuación por pulverización. A las soluciones para rociado, se le añadió Approach BI (Kao Corp.) en una cantidad 1/1000.

30

### (2) Evaluación para el control de la antracnosis del melón

Las soluciones de ácido glutámico 20 mM, serina 20 mM y treonina 20 mM se pulverizaron cada una sobre las primeras hojas verdaderas de plantas de melón dos semanas después de la siembra, y 48 horas después de la pulverización, se inoculó el hongo de la antracnosis de la planta *Cucurbitaceae* [*Colletotrichum lagenarium*] (syn.: *C. orbiculare*). Se realizó la inoculación pulverizando una suspensión de conidios ( $1 \times 10^5$  conidios/ml) sobre las superficies de las hojas. Después de la inoculación por pulverización, se infectó el hongo de antracnosis de la planta *Cucurbitaceae* en las plantas, dejando las plantas inoculadas colocadas en un lugar oscuro y húmedo durante 24 horas. Se realizó la evaluación comparando la proporción de brote numéricamente indicado de la enfermedad como la gravedad de la enfermedad. Esto es, se clasificó la gravedad en las 4 etapas siguientes indicadas con las puntuaciones de la misma [0: ningún síntoma, 1: brote en menos de un 20 % de las hojas, 2: brote en un 20 % o más de las hojas, 3: atizonado parcial]. Los resultados se muestran en la tabla 1. Se aplicó cada solución a tres individuos, y se muestra cada una de las gravedades de los individuos. Como se muestra en la tabla 1, se demostró que, en comparación con el control, la infección del microbio patógeno se pudo suprimir significativamente por la aplicación foliar de ácido glutámico, treonina o serina.

45

Tabla 1

Solución de tratamiento	Proporción de brote en cada individuo		
Control	2	2	3
Glu 20 mM	1	1	1
Thr 20 mM	1	1	1
Ser 20 mM	1	1	1

50

### Ejemplo 4: Efecto de la aplicación en la rizosfera de aminoácido para el control de la antracnosis de la planta *Cucurbitaceae* en pepino

Se sumergieron raíces de plantas de pepino dos semanas después de la siembra en una solución de ácido glutámico 10 mM, y 48 horas después de la inmersión, se inoculó el hongo de antracnosis de la planta *Cucurbitaceae* [*Colletotrichum lagenarium*] (syn.: *C. orbiculare*). Se realizó la inoculación pulverizando una suspensión de conidios ( $1 \times 10^5$  conidios/ml) sobre las superficies de las hojas. Después de la inoculación por pulverización, se infectó el hongo de antracnosis de la planta *Cucurbitaceae* en las plantas, dejando las plantas

55

- 5 inoculadas colocadas en un lugar oscuro y húmedo durante 24 horas. Se realizó la evaluación contando el número de lesiones patológicas que surgieron en cada hoja tratada 7 días después de la inoculación. Los resultados se muestran en la fig. 9. Se muestran los valores de promedio y DE de los resultados del experimento llevado a cabo por triplicado. Como se muestra en la fig. 9, se demostró que, en comparación con el resultado del control, la infección del microbio patógeno se pudo suprimir significativamente por la aplicación de ácido glutámico a la rizosfera.

**Aplicabilidad industrial**

- 10 El uso de un agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae* de la presente invención es altamente seguro, y el agente se puede producir a bajo costo. Por otra parte, se puede potenciar eficazmente la resistencia a enfermedades de las plantas *cucurbitáceas* por el procedimiento de la presente invención.
- 15 Se sabe que el uso continuo de productos químicos agrícolas del tipo que actúa directamente sobre los microbios patógenos de enfermedades de plantas, tales como fungicidas, se presta con frecuencia a la aparición de cepas mutantes resistentes a los productos químicos agrícolas, pero las cepas resistentes apenas aparecen para los productos químicos agrícolas del tipo de inducción de resistencia, y por tanto, se pueden usar durante un período de tiempo largo. Los aminoácidos como ingrediente activo del agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de
- 20 la presente invención previenen la infección de microbios patógenos induciendo resistencia a las enfermedades, no por la acción antimicrobiana directa sobre los microbios patógenos. Por lo tanto, se espera que apenas se preste a la aparición de cepas mutantes, y se pueda usar durante un período de tiempo largo, y por tanto, es extremadamente útil industrialmente.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de ácido glutámico y treonina en un agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae*.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente contiene ácido glutámico en de 5 mM a 100 mM, y contiene además treonina en de 2 mM a 100 mM.
- 10 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el agente contiene ácido glutámico en de 5 a 0 mM, y contiene además treonina en de 2 a 50 mM.
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la planta *Cucurbitaceae* es pepino, melón, calabaza o sandía.
- 15 5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la enfermedad es moho pulverulento del pepino o antracnosis del pepino.
- 20 6. Uso de ácido glutámico y alanina en un agente para potenciar la resistencia a una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae*, en el que el agente comprende ácido glutámico en de 5 mM a 100 mM, y contiene además alanina en de 2 mM a 100 mM.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el agente contiene ácido glutámico en de 5 mM a 0 mM, y contiene además alanina en de 2 mM a 50 mM.
- 25 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que la planta de *Cucurbitaceae* es pepino, melón, calabaza o sandía.
9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la enfermedad es moho pulverulento del pepino o antracnosis del pepino.
- 30 10. Un procedimiento para controlar una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae*, que comprende tratar la planta *Cucurbitaceae* con el agente como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 11. Un procedimiento para controlar una enfermedad de una planta *Cucurbitaceae*, que comprende tratar la planta *Cucurbitaceae* con el agente como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.

Fig. 1

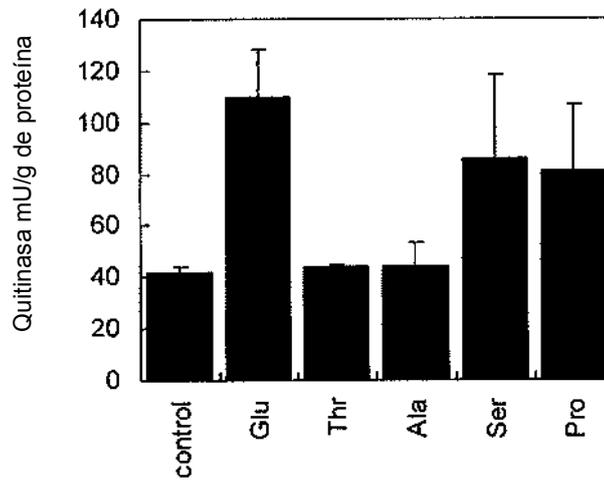


Fig. 2

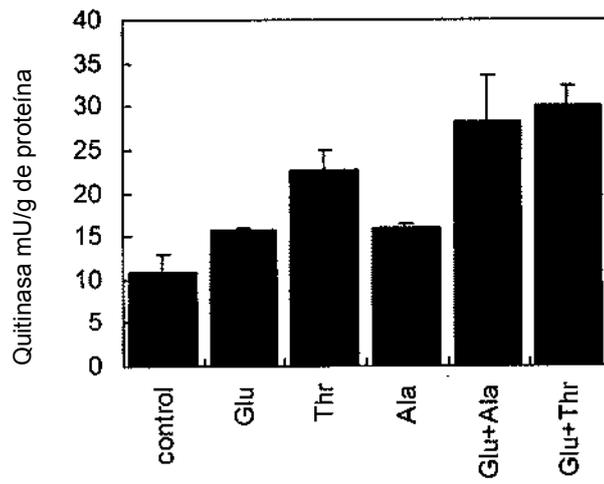


Fig. 3

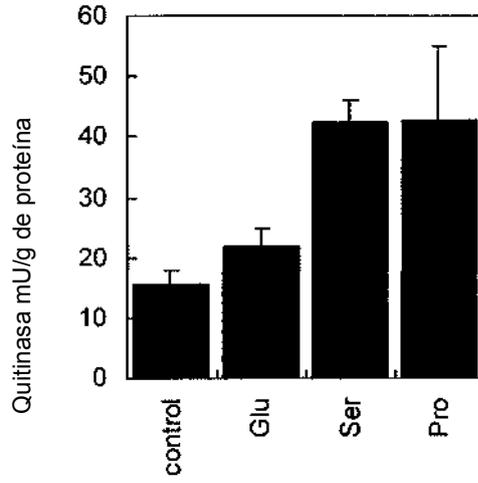
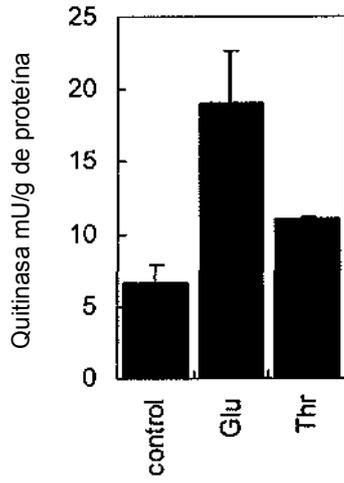


Fig. 4

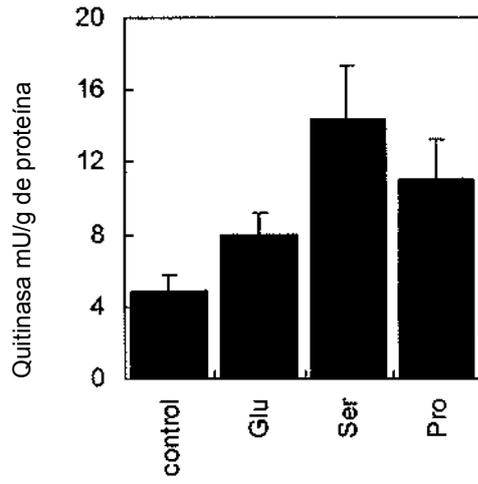
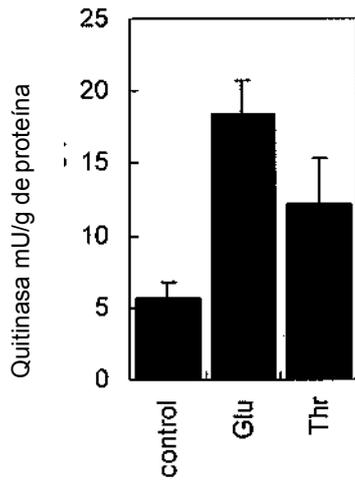


Fig. 5

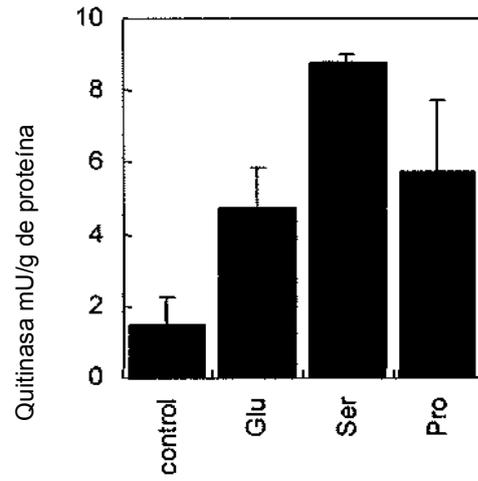
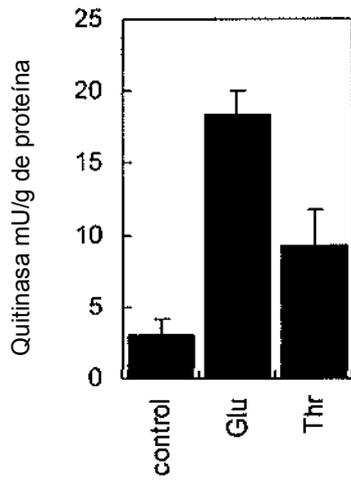
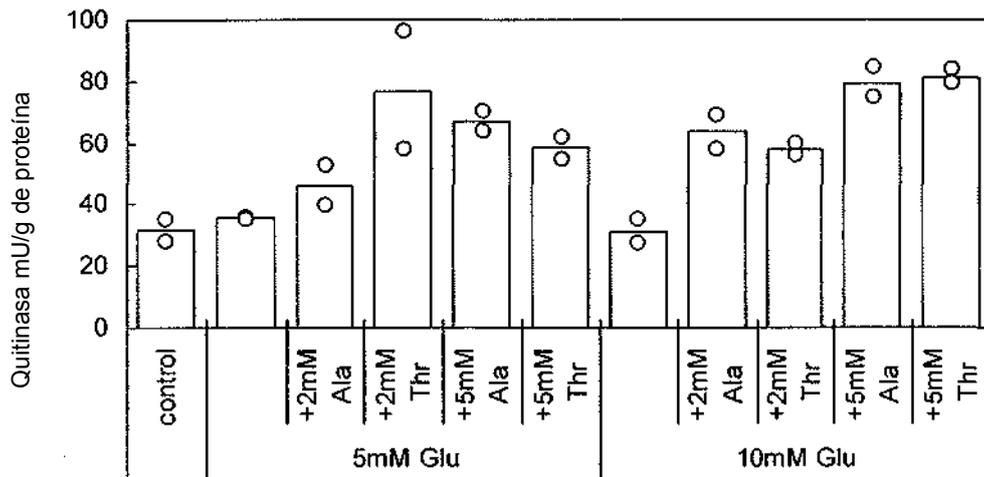


Fig. 6



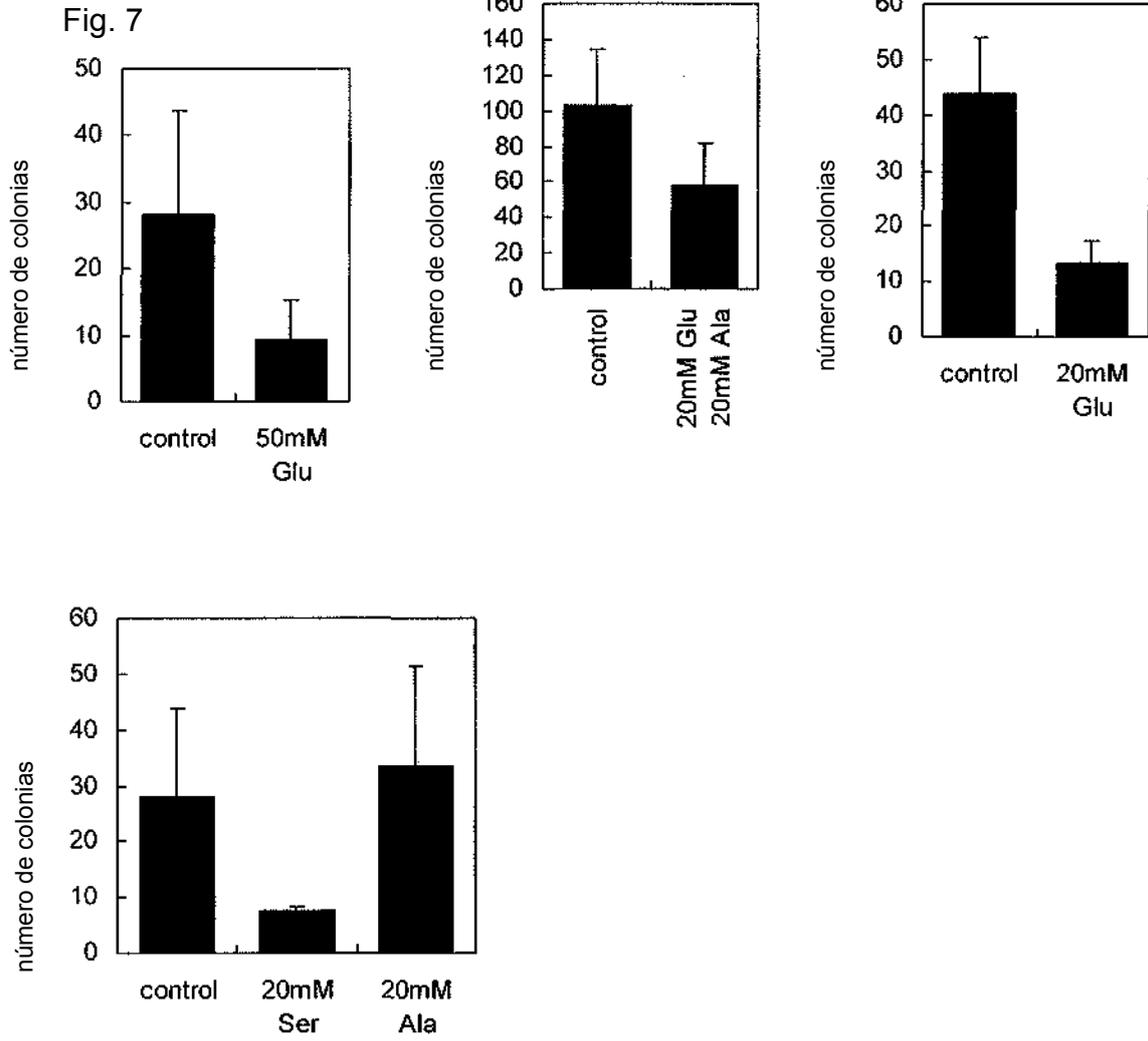


Fig. 8

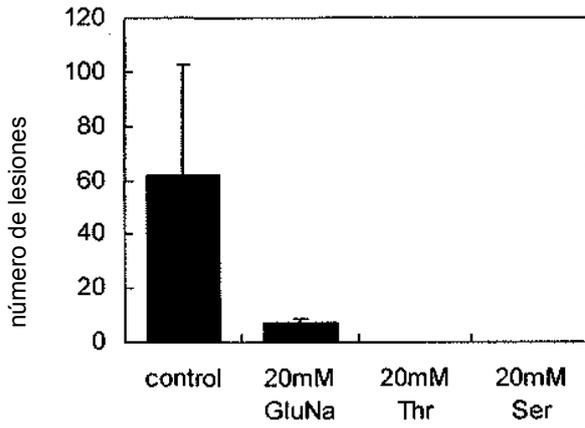
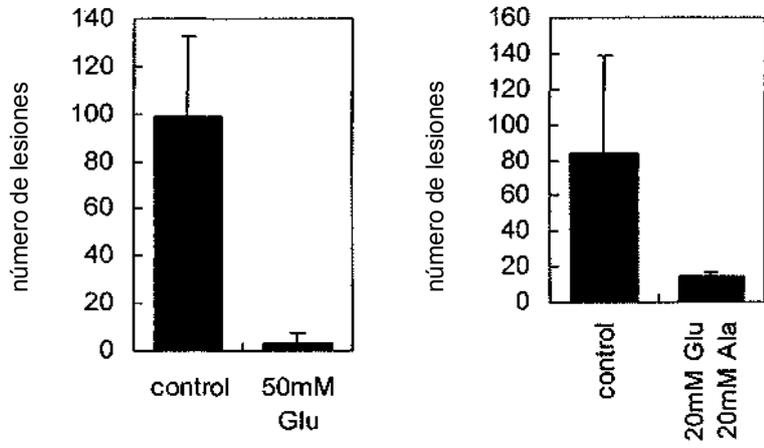


Fig. 9

