

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 843**

51 Int. Cl.:

A01P 3/00 (2006.01)
A01N 43/42 (2006.01)
A01N 31/16 (2006.01)
A01N 43/16 (2006.01)
A01N 43/78 (2006.01)
A01N 47/14 (2006.01)
A01N 43/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2013 PCT/EP2013/063574**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14012766**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2013 E 13731833 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2871964**

54 Título: **Agentes potenciadores para proteger las plantas contra infecciones fúngicas**

30 Prioridad:

16.07.2012 EP 12176613

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

30.04.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ D'ANGERS (100.0%)
40 rue de Rennes
49000 Angers, FR**

72 Inventor/es:

**SIMONEAU, PHILIPPE;
GUILLEMETTE, THOMAS;
RICHOMME, PASCAL y
HELESBEUX, JEAN-JACQUES**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 757 843 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

Agentes potenciadores para proteger las plantas contra infecciones fúngicas

Campo de invención

5 La presente invención se refiere a la protección de cultivos contra infecciones fúngicas. La presente invención se refiere más específicamente a agentes potenciadores y composiciones que comprenden los mismos, útiles para proteger los órganos de las plantas contra infecciones fúngicas.

Antecedentes de la invención

10 Los hongos fitopatógenos pueden afectar una variedad de órganos vegetales, tales como hojas, tallos, frutos y semillas. Por lo general, los frutos de plantas infectadas no son aptos para la venta, y una infección de hojas o semillas puede alterar el desarrollo o la germinación de las plantas, causando una reducción significativa de la productividad. Por lo tanto, las infecciones fúngicas pueden provocar pérdidas económicas sustanciales. El control de las infecciones fúngicas de los cultivos es, de este modo, un problema económico importante.

15 Los fungicidas químicos convencionales usados comúnmente para proteger los cultivos contra la infección fúngica presentan el inconveniente de ser altamente contaminante para el medio ambiente, especialmente para el suministro de suelo y agua. Además, estos productos pueden ser tóxicos para los humanos.

Otros agentes se dirigen a rutas fúngicas, tales como, por ejemplo, rutas metabólicas. Los inhibidores de la biosíntesis de esteroides, tales como, por ejemplo, el triadimenol, se han usado para controlar hongos. Además, el documento WO2006/066974 describe el uso de inhibidores de metionina sintasa para el tratamiento de enfermedades fúngicas de cultivos.

20 Sin embargo, tales inhibidores presentan un amplio espectro de acción y, de este modo, pueden tener un efecto inhibitor sobre los hongos presentes de forma natural en el suelo, lo que induce una alteración del ecosistema del suelo.

De este modo, existe la necesidad de una composición fungicida específica de hongos que ataquen una planta de interés, sin impactar los hongos del suelo.

25 En respuesta a una infección fúngica, las plantas sintetizan moléculas de defensa antifúngicas, tales como, por ejemplo, fitoalexinas. Los inventores demostraron que un hongo fitopatógeno puede adaptar su metabolismo para protegerse contra los efectos tóxicos de estas moléculas, especialmente a través de la activación de las vías de señalización. El desarrollo de un inhibidor de dichas rutas puede ser de este modo una forma prometedora para proteger las plantas sin alterar el ecosistema del suelo.

30 Además, por el bien de la salud humana, podría ser interesante reducir la cantidad de fungicida aplicado en los cultivos. De hecho, como el fungicida aplicado en los cultivos se puede encontrar en los alimentos, el principio de precaución requiere minimizar la cantidad de fungicida usada.

El documento WO 01/62089 describe el uso de productos naturales que pertenecen a la clase de alcaloides tales como quelitrina, camptotecina, quelidonina, coricavamina y/o coricacidina, solos o como mezclas.

35 Adicionalmente, el documento US 2006/0228428 enseña las propiedades antifúngicas de extractos de plantas que contienen berberina y otros alcaloides. Tanto el documento WO 01/62089 como el documento US 2006/0228428 atribuyen las propiedades antifúngicas a la berberina que posee actividades antifúngicas no selectivas. Adicionalmente, como se reconoce generalmente en la técnica, estos documentos sugieren el uso de concentraciones crecientes de compuestos antifúngicos para obtener un fungicida eficaz.

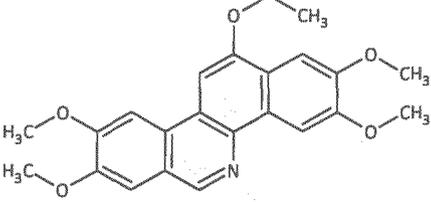
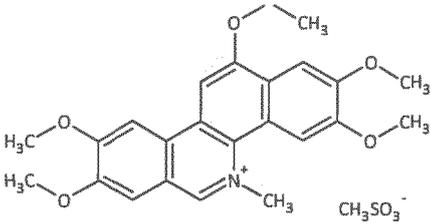
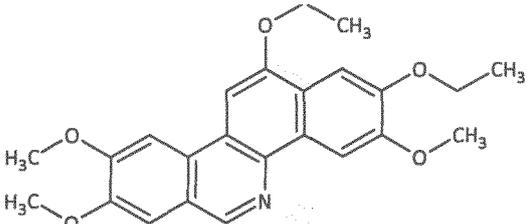
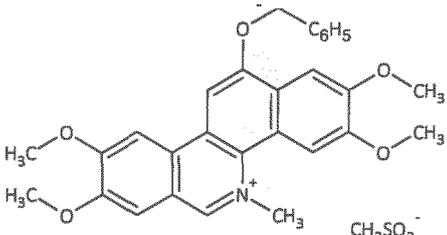
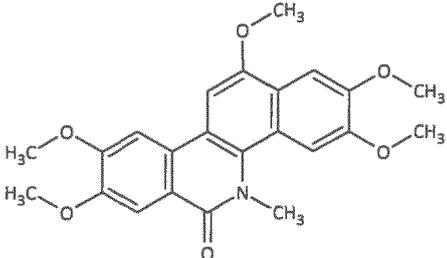
40 El documento WO 01/62089 y el documento US 2006/0228428 no enseñan cómo minimizar la cantidad de un compuesto antifúngico selectivo y aún obtener los efectos fungicidas o fungistáticos deseados.

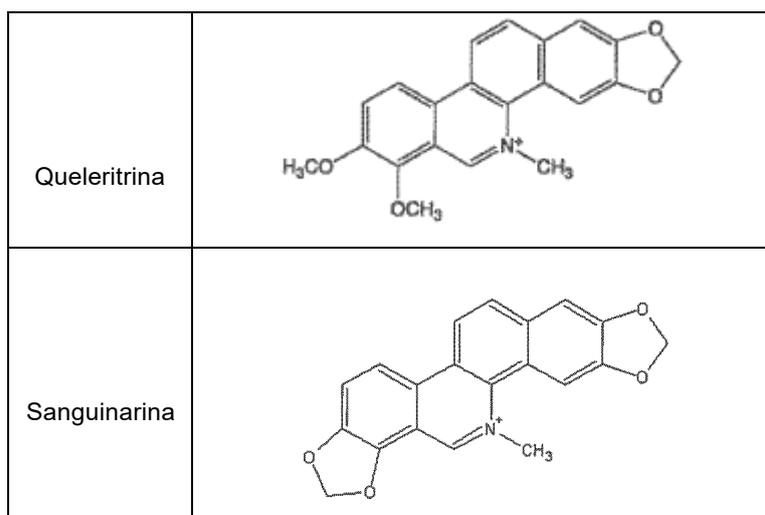
45 Los inventores en este documento identificaron agentes que potencian la acción de las moléculas de defensa de la planta, tales como, por ejemplo, inhibidores de las rutas de señalización activadas en un hongo fitopatógeno en respuesta a una molécula de defensa de la planta. Debido a este efecto potenciador, es posible reducir la cantidad de fungicida aplicado en los cultivos.

La presente invención se refiere de este modo a una composición o producto que comprende dicho agente potenciador. En una realización, la invención se enfoca en destruir hongos cuando los hongos realmente están atacando una planta de interés, sin impactar los hongos del suelo, evitando de este modo cualquier perturbación del ecosistema del suelo.

50 Resumen

Esta invención se refiere a un método para prevenir, controlar o tratar una infección fúngica en un órgano de la planta que comprende aplicar a dicho órgano de la planta una composición que comprende un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta seleccionada entre:

Compuesto	Estructura
1	
2	
3	
4	
5	



en asociación con un vehículo fitofarmacéutico,

en el que:

- 5 el agente potenciador tiene una cantidad que varía desde 10 a 200 μM ; y la molécula de defensa de la planta es una molécula seleccionada de brasinina, camalexina, resveratrol, 3,5-dihidroxibifenilo, aucuparina y 6-metoximeleína, y que pertenece al sistema inmune de la planta y se usa por un órgano de la planta para resistir a una infección fúngica.

- 10 Esta invención también se refiere a una composición que comprende un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta como se describe anteriormente en una cantidad que varía desde 10 a 200 μM y una molécula de defensa de la planta seleccionada de brasinina, camalexina, resveratrol, 3,5-dihidroxibifenilo, aucuparina y 6-metoximeleína. Otro objeto de esta invención es una composición fitosanitaria o fitofarmacéutica que comprende la composición como se describió anteriormente, en asociación con un vehículo fitofarmacéutico.

En una realización, la infección fúngica es una infección por un hongo fitopatógeno, preferiblemente seleccionado del grupo que comprende *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria dauci* y *Venturia inaequalis*.

- 15 Según la invención, el órgano de la planta se puede seleccionar de la lista que comprende la familia Brassicaceae, tal como, por ejemplo, *Brassica oleracea*; familia Apiaceae, tales como, por ejemplo, *Daucus carota* subsp. *Sativus*; familia Vitaceae, tales como, por ejemplo, la familia *Vitis vinifera*; y Rosaceae, tales como, por ejemplo, *Malus domestica*.

- 20 Según la invención, el agente potenciador de una molécula de defensa de la planta seleccionada de las moléculas como se describe anteriormente puede ser un agente potenciador homólogo de una molécula de defensa de la planta o un agente potenciador heterólogo de una molécula de defensa de la planta.

En una realización preferida de la invención, el agente potenciador de una molécula de defensa de la planta es la quelerritrina.

- 25 En una realización preferida de la invención, el método se implementa en un órgano de la planta que es *Brassica oleracea*, para prevenir, controlar o tratar una infección fúngica por *Alternaria brassicicola*; en esta realización, el agente potenciador de una molécula de defensa de la planta es preferiblemente quelerritrina.

En una realización, la composición de la invención comprende además (1) un agente para estimular la síntesis de una molécula de defensa de la planta, (2) un insecticida y/o (3) un herbicida.

- 30 Un objeto adicional de esta invención es una composición de recubrimiento, revestimiento o de formación de pellas que comprende el producto de la composición como se describe anteriormente.

Esta invención también se refiere a una semilla recubierta, revestida o en forma de pellas con un producto o una composición de la invención.

Definiciones

En el sentido de la presente invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"Alquilo": cualquier cadena de hidrocarburo lineal o ramificada saturada, con 1 a 12 átomos de carbono, preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono, y más preferiblemente metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo y tert-butilo.

5 "Alqueno": cualquier cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace, de 2 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 6 átomos de carbono, y más preferiblemente metileno, etileno, propileno, isopropileno, n-butileno, secbutileno, isobutileno y tert-butileno.

"Alquilsulfonato": cualquier grupo O-SO₂-alquilo.

10 "Alcaloide": se refiere a un gran grupo de compuestos de origen natural que comprenden átomos de nitrógeno básicos. Los ejemplos de alcaloides incluyen, pero no se limitan a, derivados de isoquinolina, derivados de indol, derivados de piridina, derivados de pirrolidina, derivados de tropano, derivados de pirrolizidina, derivados de piperidina, derivados de quinolizidina, derivados de indolizidina, derivados de oxazol, derivados de isoxazol, derivados de tiazol, derivados de isotiazol, derivados de quinazolina, derivados de acridina, derivados de quinolona, derivados de imidazol y derivados de purina.

15 "Anillo" se refiere a una disposición molecular cíclica de 4 a 20 átomos, preferiblemente de 5 o 6 átomos. El anillo puede ser un homociclo, donde todos los átomos son carbonos, o un heterociclo, donde al menos un átomo no es carbono, y preferiblemente es N, O o S.

20 "Molécula de defensa de la planta" se refiere a una molécula que pertenece al sistema inmune de la planta y usada por un órgano de la planta para resistir una agresión, tal como, por ejemplo, una infección fúngica. Una molécula de defensa de la planta de este modo puede ser tóxica para el hongo fitopatógeno que infecta el órgano de la planta. En una realización, una molécula de defensa de la planta es una molécula cuya síntesis no es constitutiva (esto es, la molécula no es sintetizada a un nivel constante por el órgano de la planta) sino que es inducida por una agresión o un elicitador (inductor de resistencia a los patógenos). En una realización, dicha molécula de defensa de la planta es una fitoalexina.

25 La "cantidad no fungicida" representa una cantidad necesaria para alterar y/o inhibir las vías de señalización implicadas en el crecimiento y/o desarrollo de hongos, siendo dicha cantidad menor que una cantidad fungicida. Como se usa en este documento, un "efecto fungistático" se refiere a un efecto inhibitorio y/o de detención y/o control sobre el crecimiento y/o desarrollo de hongos sin destruirlos, mientras que un "efecto fungicida" se refiere a la destrucción de hongos.

30 Los métodos para determinar la cantidad no fungicida de un producto son bien conocidos para los expertos en el arte. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, prueba de crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de dicho producto, que se pueden llevar a cabo en cultivo en medio líquido o sólido.

35 En una realización de la invención, el efecto fungistático o fungicida se mide después de al menos 5 horas de cultivo, preferiblemente al menos 10 horas, más preferiblemente al menos 20 horas, e incluso más preferiblemente al menos 30 horas. En una realización de la invención, el efecto fungistático o fungicida se evalúa comparando el crecimiento de hongos tratados con el crecimiento de hongos no tratados (controles cultivados en ausencia del producto probado).

Un ejemplo de tal método puede ser el siguiente (Prueba A):

40 Las suspensiones de conidias fúngicas (el material de partida es, por ejemplo, 10⁵ conidias/mL) se cultivan en medio líquido, tal como, por ejemplo, 300 µL de medio PBD, en pocillos de microplacas a 25°C con agitación a 175 rpm durante 5 minutos cada 10 minutos. Se agregan concentraciones crecientes del producto probado en los pocillos, y se mide el crecimiento de hongos, durante al menos 5 horas, preferiblemente al menos 10, 20, 30 horas. Los métodos para medir el crecimiento de hongos son bien conocidos para los expertos en el arte. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, fotometría, tales como, por ejemplo, métodos espectrofotométricos; o nefelometría, tal como, por ejemplo, nefelometría láser como se describe en Joubert et al (Biotechniques, 2010, 48:399-404). La inhibición del crecimiento se mide comparando el área bajo las curvas (AUC) de las muestras tratadas y de los controles no tratados. La prueba A se lleva a cabo en el ejemplo 1.

50 "Agente potenciador de una molécula de defensa de la planta" se refiere a un agente que, cuando está asociado, en una cantidad no fungicida, con una molécula de defensa de la planta tiene un efecto fungicida o fungistático; preferiblemente el agente potenciador y la molécula de defensa de la planta se usan ambos en una cantidad no fungicida. En la presente invención, el agente potenciador es un producto capaz de alterar y/o inhibir las vías de señalización implicadas en el crecimiento y/o desarrollo de hongos, cuando se aplica en una cantidad no fungicida. En una realización, el agente potenciador no se selecciona en el grupo que consiste en un ácido fosforoso o un derivado de ácido fosforoso; ácido salicílico; ácido succínico; ácido láctico; ácido jasmónico; ácido isonicotínico; ácido araquidónico; ácido dicloroisonicotínico; berberina o cloruro de berberina; un extracto de levadura o fragmento del mismo; un extracto de algas; un glicoconjugado; un polisacárido, que incluye quitosano; un benzotiadiazol

En una realización, un efecto fungicida o fungistático significa que no se mide el crecimiento de hongos después de 5 horas de cultivo, preferiblemente después de 10, 20, 30 o más horas de cultivo. En otra realización, un efecto fungicida o fungistático significa que el crecimiento de hongos de los hongos tratados se reduce en al menos 50%, preferiblemente al menos 60, 70, 80, 90% en comparación con hongos no tratados u hongos tratados con una cantidad no fungicida de dicho agente o de dicha molécula de defensa de la planta después de 5 horas de cultivo, preferiblemente después de 10, 20, 30 o más horas de cultivo.

En una realización, un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta es un agente que tiene efecto fungicida o fungistático cuando se prueba en las condiciones de la prueba B.

Prueba B:

- 1) Determinar una cantidad no fungicida de dicho agente, preferiblemente según la prueba A;
- 2) Determinar una cantidad no fungicida de una molécula de defensa de la planta, preferiblemente según la prueba A;
- 3) Medir el crecimiento de conidias fúngicas en un medio que comprende una combinación de una cantidad no fungicida del agente, como se determina en la etapa 1, y una cantidad no fungicida de la molécula de defensa de la planta, como se determina en la etapa 2. En una realización, el crecimiento se mide de la siguiente manera: las suspensiones de conidias fúngicas (material de partida: 10^5 conidias/mL) se cultivan en medio líquido, tal como, por ejemplo, 300 μ L de medio PBD, en pocillos de microplacas a 25°C con agitación a 175 rpm, durante 5 minutos cada 10 minutos. Las concentraciones no fungicidas del agente probado y de la molécula de defensa de la planta probada se agregan en los pocillos, y el crecimiento de hongos se mide durante al menos 5 horas, preferiblemente al menos 10, 20, 30 horas. Los métodos para medir el crecimiento de hongos son bien conocidos para los expertos en el arte. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, fotometría, tales como, por ejemplo, métodos espectrofotométricos; o nefelometría, tal como, por ejemplo, nefelometría láser como se describe en Joubert et al (Biotechniques, 2010, 48:399-404). La inhibición del crecimiento se mide comparando el área bajo las curvas (AUC) de las muestras tratadas y de los controles no tratados.

La prueba B se lleva a cabo en el ejemplo 1.

En una realización, el agente potenciador de una molécula de defensa de la planta es un agente potenciador homólogo. Como se usa en este documento, un agente potenciador "homólogo" de una molécula de defensa de la planta potencia el efecto de la molécula de defensa de la planta sintetizada por el órgano de la planta que se va a tratar.

En otra realización, el agente potenciador de una molécula de defensa de la planta es un agente potenciador heterólogo. Como se usa en este documento, un agente potenciador "heterólogo" de una molécula de defensa de la planta potencia el efecto de una molécula de defensa de la planta que no es la molécula de defensa de la planta sintetizada por el órgano de la planta que se va a tratar.

La "cantidad de potencialización" se refiere a la cantidad de dicho agente potenciador, que no es fungicida per se, pero que, cuando se combina con una molécula de defensa de la planta, preferiblemente con una cantidad no fungicida per se de dicha molécula de defensa de la planta, es fungicida o fungistático, preferiblemente fungistático, esto es, inhibe o detiene el crecimiento de hongos. En una realización, la cantidad potenciadora de un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta se determina según la prueba B.

"Efecto sinérgico": define la interacción de dos o más agentes que actúan juntos de manera positiva para producir un efecto en una cantidad que no podrían alcanzar por separado. Una "sinergia aditiva" define una sinergia en la que el efecto combinado de los agentes es igual a la suma de los efectos de cada agente solo. Cuando el efecto combinado es mayor que la suma de los efectos de cada agente que opera por sí mismo, la sinergia se denomina "efecto potenciador". En una realización, el efecto sinérgico es una sinergia aditiva. En otra realización, el efecto sinérgico es un efecto potenciador.

"Hongos fitopatógenos" se refiere a hongos patógenos para los órganos de las plantas.

Los ejemplos de hongos fitopatógenos incluyen, pero no se limitan a, hongos que pertenecen a las clases Ascomycetes y Basidiomycetes, tales como, por ejemplo, hongos del orden de Erysiphales (tales como, por ejemplo, familia Erysiphaceae, géneros Uncinula, Erysiphe, Sphaerotheca); hongos del orden de Dothideales (tales como, por ejemplo, familia Venturiaceae género Venturia); hongos del orden de Helotiales (tales como, por ejemplo, familia Sclerotiniaceae, géneros Sclerotinia, Monilia/Monilinia, Botrytis/ Botryotinia); hongos del orden de Taphrinales (tales como, por ejemplo, familia Taphrinaceae, género Taphrina); hongos del orden de Pleosporales (tales como, por ejemplo, familia Pleosporaceae, género Alternaria); hongos del orden de Magnaporthales (tales como, por ejemplo, familia Magnaportaceae género Magnaporthe - Pyricularia); hongos del orden de Hypocreales (tales como, por ejemplo, familia Nectriaceae, género Fusarium); hongos del orden de Uredinales (tales como, por ejemplo, familia Pucciniaceae, género Puccinia); y hongos del orden de Ustilaginales (tales como, por ejemplo, familia Ustilaginaceae, género Ustilago).

"Órgano de planta" se refiere a una planta, una parte de planta o un material de propagación de plantas. Los ejemplos de órganos vegetales incluyen, pero no se limitan a, plantas enteras, hojas, tallos, frutas, semillas, plantas, parte de plantas, esquejes, tubérculos, raíces, bulbos, rizomas y similares.

5 "Vehículo fitofarmacéutico" se refiere a un vehículo que no produce una reacción adversa u otra reacción adversa cuando se aplica sobre un órgano de la planta. Un ejemplo de vehículo fitofarmacéutico incluye, pero no se limita a, agua.

10 "Agente para estimular la producción de una molécula de defensa de la planta" o "inductor" se refiere a un compuesto que, cuando se aplica sobre un órgano de la planta, conduce a reacciones celulares bioquímicas y/o fisiológicas que resultan en la síntesis, o a un aumento de la síntesis de una molécula de defensa de la planta, tales como, por ejemplo, fitoalexina. Dichos agentes también se pueden denominar "estimuladores de defensa natural". Los agentes para estimular la síntesis de una molécula de defensa de la planta son conocidos en la técnica anterior y pueden ser de origen natural (animal, vegetal o mineral) o sintéticos. Cuando estos agentes entran en contacto con la planta del órgano, se activan las vías de señalización. El metabolismo de la planta si se modifica y las moléculas de defensa de la planta se sintetizan en una cantidad no fungicida.

15 Los ejemplos de dichos agentes de origen natural incluyen, pero no se limitan a, extractos de algas tales como, por ejemplo, laminarina; y extracto de plantas tales como, por ejemplo, extracto de *Reynoutria sachalinensis*.

Otros ejemplos de dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, acibenzolar-S-metilo, aminoácidos que contienen azufre, tales como, por ejemplo, metionina, cisteína y cistina; D-glucosa y mezclas de aminoácidos que contienen azufre y D-glucosa.

20 "Producto fitosanitario o fitofarmacéutico" se refiere a sustancias activas y preparaciones que contienen una o más sustancias activas, destinadas a proteger los órganos de las plantas contra un organismo nocivo o prevenir la acción de un organismo nocivo.

"Prevenir" significa evitar la aparición de al menos un efecto adverso o síntoma de una infección fúngica.

25 "Controlar" significa detener la progresión de la infección fúngica y prevenir su propagación a través de las partes sanas del órgano de la planta.

"Tratamiento" significa eliminar la contaminación por hongos, esto es, que ya no hay hongos viables en el órgano de la planta.

30 "Cantidad fitofarmacéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un agente necesario y suficiente para, sin causar efectos secundarios negativos o adversos significativos para el órgano de la planta, (i) prevenir una infección fúngica; (ii) ralentizar o detener la progresión, agravamiento o deterioro de uno o más síntomas de la infección fúngica; (iii) aliviar dichos síntomas y/o (iv) eliminar la contaminación por hongos.

35 "Mejora de las características de crecimiento de un órgano de la planta" se puede manifestar en la mejora del rendimiento y/o vigor de la planta y/o la calidad del producto cosechado de la planta, o la calificación de la raíz, o la emergencia, o el contenido de proteína, o mayor macollamiento, o una lámina de hoja más grande, o menos hojas basales muertas, o macollos más fuertes, o se necesita menos fertilizante, o se necesitan menos semillas, o macollos más productivos, o floración temprana, o madurez temprana del grano, o menos verso de planta (alojamiento), o aumento del crecimiento de brotes, o germinación temprana, o cualquier combinación de estos factores, o cualquier otra ventaja familiar para un experto en el arte.

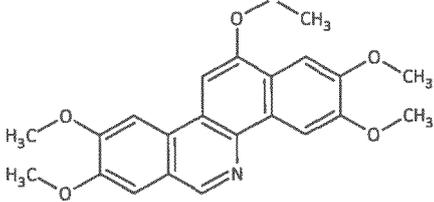
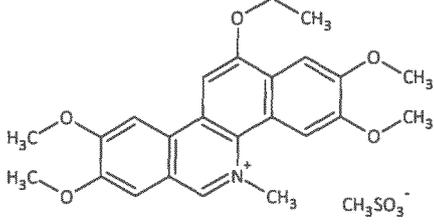
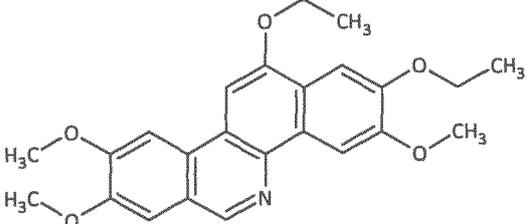
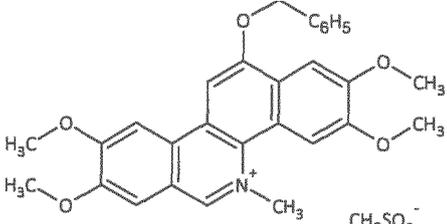
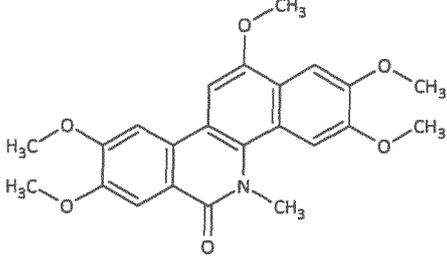
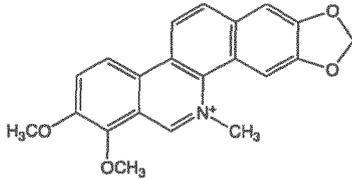
40 "Revestimiento, "recubrimiento" y "formación de pellas" se refieren a la aplicación directa de uno o más productos en un órgano de la planta, generalmente en una semilla, para facilitar la plántula y mejorar la tasa de éxito de la plántula. El "Revestimiento" es la operación más simple, en la que el producto o la mezcla de productos tiene la forma de un polvo o una pasta húmeda. Para el "recubrimiento", el producto o la mezcla de productos se asocia con un agente fijador, con el fin de mejorar la adherencia del producto. La "formación de pellas" de una semilla se refiere a la aplicación de productos en capas sucesivas, en la que cada capa confiere propiedades específicas a la semilla.

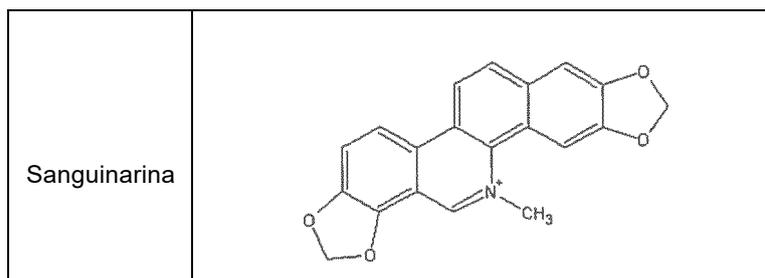
45 "Acerca de" que precede a una figura significa más o menos 10% del valor de dicha figura.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un método para prevenir, controlar o tratar una infección fúngica en un órgano de la planta que comprende aplicar a dicho órgano de la planta una composición que comprende un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta seleccionada entre:

Compuesto	Estructura
-----------	------------

<p>1</p>	
<p>2</p>	
<p>3</p>	
<p>4</p>	
<p>5</p>	
<p>Quelerritrina</p>	



en asociación con un vehículo fitofarmacéutico,

en el que:

el agente potenciador está en una cantidad que varía desde 10 a 200 μM ; y

- 5 la molécula de defensa de la planta es una molécula seleccionada entre brasinina, camalexina, resveratrol, 3,5-dihidroxibifenilo, aucuparina y 6-metoximeleína, y que pertenece al sistema inmune de la planta y se usa por un órgano de la planta para resistir a una infección fúngica.

- 10 La presente invención también se refiere al uso de una composición fitosanitaria que comprende un agente potenciador como se describe anteriormente, en una cantidad que varía desde 10 a 200 μM , en asociación con un vehículo fitofarmacéutico, para proteger una planta o un cultivo contra una infección fúngica.

La presente invención también se refiere a una composición que comprende un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta como se describe anteriormente en una cantidad que varía desde 10 a 200 μM y una molécula de defensa de la planta seleccionada de brasinina, camalexina, resveratrol, 3,5-dihidroxibifenilo, aucuparina y 6-metoximeleína.

- 15 Según la invención, los agentes potenciadores se seleccionan de:

Compuesto	Estructura
1	
2	
3	

4	
5	
Quelerritrina	
Sanguinarina	

Según la invención, el agente potenciador es un inhibidor de una ruta de señalización activada en un hongo fitopatógeno dado, siendo dicha activación, por ejemplo, en respuesta a una exposición a una molécula de defensa de la planta.

- 5 Como se usa en este documento, una "ruta de señalización" se refiere a una red de proteínas que actúan juntas para controlar una o más funciones celulares. Después de que la primera molécula de la ruta ha recibido una señal, activa otra molécula. Este proceso se repite hasta que se activa la última molécula y se lleva a cabo la función celular implicada. Un ejemplo de ruta de señalización incluye como primera molécula un receptor transmembrana, luego un conjunto de quinasas y, por último, un factor de transcripción.
- 10 De acuerdo con lo anterior, un "inhibidor de una ruta de señalización" es un compuesto que limita, previene o detiene la activación de cualquiera de las proteínas de una ruta de señalización, dando como resultado la incapacidad de la ruta para controlar la función celular que generalmente controla. Con referencia al ejemplo del párrafo anterior, un inhibidor puede actuar, sin limitación, sobre el receptor transmembrana (por ejemplo, el inhibidor puede ser un agonista de dicho receptor), sobre la actividad catalítica de una quinasa (por ejemplo, el inhibidor puede ser un inhibidor catalítico de la actividad enzimática de la quinasa) o puede prevenir la acción del factor de transcripción.
- 15

El término "una ruta de señalización activada" se refiere a una ruta de señalización en la que la primera molécula ha recibido una señal que conduce a la activación de las otras proteínas de la red. Los métodos para determinar si una ruta de señalización se activa en respuesta a la exposición de una molécula particular son bien conocidos para los expertos en el arte, y se pueden llevar a cabo en cultivos de hongos. Los ejemplos de dichos métodos incluyen, sin

- limitación, el análisis del estado de fosforilación de las quinasas de la ruta (por ejemplo, por Western Blot) o el análisis de un gen indicador colocado bajo el control de un promotor específico del factor de transcripción. En una realización, la expresión del gen indicador se evalúa por RT-PCR o RT-qPCR. En otra realización, la expresión del gen indicador induce características identificables visualmente a una célula. Los ejemplos de tales genes indicadores incluyen, pero no se limitan a, genes que codifican proteínas fluorescentes o luminiscentes, tales como, por ejemplo, GFP o luciferasa. Otro ejemplo de un gen indicador es el gen que codifica la enzima beta-galactosidasa, cuya expresión se puede visualizar fácilmente en un medio de cultivo que comprende un análogo de sustrato incoloro que es transformado por la enzima en un producto coloreado.
- En una realización de la invención, la ruta de señalización activada en el hongo fitopatógeno en respuesta a una exposición a una molécula de defensa de la planta es la ruta CWI, HOG y/o UPR, y el inhibidor usado en la presente invención es de este modo un inhibidor de la ruta CWI, HOG y/o UPR respectivamente.
- En una realización, la ruta de señalización es la ruta CWI. La ruta de CWI (en la que CWI significa Integridad de la pared celular) es una ruta de señalización implicada en el fortalecimiento de la pared celular y en la reparación de daños de la pared celular, en condiciones de estrés ambiental. Las proteínas de la ruta CWI incluyen, pero no se limitan a, la serina/treonina quinasa Pkc1 (proteína quinasa C1); proteínas de una cascada de MAP quinasas (proteínas quinasas activadas por mitógeno): Bck1 (derivación de la quinasa C), Mkk1 (quinasa 1- proteína quinasa activada por mitógeno), Mkk2 (quinasa-proteína quinasa 2 activada por mitógeno), Sit2 (supresión a baja temperatura 2); y el factor de transcripción Rlm1 (Resistencia a la letalidad de la sobreexpresión 1 de MKK1P386), u homólogos de estas proteínas en hongos filamentosos.
- En una realización, la activación de la ruta de CWI se puede determinar a través del análisis del estado de fosforilación de las proteínas Bck1, Mkk1, Mkk2 y/o Sit2, en la que la fosforilación de dichas proteínas es indicativa de la activación de la ruta CWI. Otra forma de analizar el estado de activación de la ruta de CWI es el análisis de la expresión de un gen colocado bajo el control de un promotor que responde al factor de transcripción Rlm1.
- Los nombres de genes y proteínas presentados en este documento corresponden a los genes y proteínas de *Saccharomyces cerevisiae*. El artesano experto sabe cómo identificar los genes o proteínas correspondientes en otra especie de hongo.
- En una realización de la invención, el inhibidor de la ruta de CWI es un inhibidor de la quinasa Pkc1, Bck1, Mkk1, Mkk2 y/o Sit2. En otra realización, el inhibidor de la ruta de CWI es un inhibidor del factor de transcripción Rlm1. En otra realización, el inhibidor de la ruta de CWI es un inhibidor de la proteína Rom1 y/o Rho1.
- En una realización preferida, el inhibidor de la ruta de CWI es un inhibidor de Pkc1. En una realización, dicho inhibidor es un inhibidor específico de PKC de hongos.
- Los métodos para identificar inhibidores de Pkc1 son bien conocidos para los expertos en el arte. Un ejemplo de tal método incluye, pero no se limita a, medir la actividad de la quinasa de Pkc1 purificada (parcialmente) en presencia de cantidades crecientes de inhibidores potenciales. Los kits útiles para medir la actividad de PKC se pueden seleccionar entre el Ensayo PepTag (Promega), el kit de ensayo MESACUP PKA/PKC; Cyclex PKC kit de ensayo de superfamilia quinasa (MBL); Kits de ensayo de proteína quinasa C (PANVERA); ensayo de quinasa basado en FRET Z'-Lyte (Invitrogen); Kit de ensayo Omnia (Invitrogen). Otros ejemplos de dicho método son las pruebas biológicas realizadas en el modelo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Pruebas C y D).
- La prueba C se basa en el papel esencial de Pkc1 en las células fúngicas: si se inhibe su función esencial, el crecimiento de las células fúngicas se verá afectado. Por lo tanto, en la prueba C, se cultivan dos cepas diferentes de *S. cerevisiae* en presencia del compuesto probado: la primera es una cepa de tipo salvaje, mientras que la segunda sobreexpresa el gen Pkc1 fúngico. Si el compuesto probado es un inhibidor de la proteína Pkc1 fúngica, se inhibirá el crecimiento de la cepa de tipo salvaje, mientras que la inducción de la sobreexpresión del gen Pkc1 fúngico heterólogo restaurará, al menos parcialmente, la tasa de crecimiento. La prueba C se lleva a cabo en el ejemplo 3.
- La prueba D se basa en el hecho de que la proteína Pkc1 está implicada en la ruta de CWI. En una situación donde la ruta de CWI se ve afectada, el crecimiento de células fúngicas se ve menos afectado por una presión osmótica alta. En consecuencia, en la prueba D, una cepa de *S. cerevisiae* se cultiva en condiciones de alta presión osmótica, en presencia o en ausencia del compuesto probado. Si dicho compuesto es un inhibidor de Pkc1, inhibirá el crecimiento de las células en condiciones normales de presión osmótica, pero no, o menos, en condiciones de alta presión osmótica. La prueba D se lleva a cabo en el ejemplo 3.
- Los ejemplos de inhibidores de Pkc1 incluyen, pero no se limitan a queleritrina, cloruro de queleritrina, 3-(1H-indol-3-il)-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)quinazolin-4-il]pirrol-2,5 -diona (AEB071), 13-HODE, AEB-071, anexina V, aprinocarsen, ARC, bisindolilmaleimida GF 109203X, bisfosfonato, briostatina-1, BSP-A1/-A2, buteína, calfofostina C, curcumina, dafnetina, dexametasona, enzastaurina, erbstatina, GO6976, H-7 hispidina, hipocrelina A, hiperecina, LY333531, midostaurina, MT477, N-miristil-Lys-Arg-Thr-Leu-Arg, NPC 15437, PAP, PKC412, R8605, RK-286C, Ro 31-8220, Rottlerin, ruboxistaurin, sotrastaurina, estaurosporina, UCN-01, UCN-02, Vanicosides A y B, y Verbascoside.

Los ejemplos de inhibidores de PKC también incluyen, pero no se limitan a, compuestos 1 a 4, queleritrina, sanguinarina.

- 5 En una realización, la ruta de señalización es la ruta HOG. La ruta HOG (en la que HOG significa Glicerol de alta osmolaridad) es una ruta de señalización implicada en la respuesta celular a una elevación en la osmolaridad externa y potencialmente en la biogénesis de la pared celular. Las proteínas de la ruta HOG incluyen, pero no se limitan a, Ypd1 (dependiente de la tirosina (Y) fosfatasa), Ssk1, Ssk2 y Ssk22 (supresor del sensor quinasa 1, 2 y 22), Cdc42 (anillo de división celular 42), Ste11, Ste 20 y Ste50 (STERile 11, 22 y 50), Pbs2 (sensibilidad a la polimixina B 2) y Hog1 (respuesta de glicerol de alta osmolaridad 1), u homólogos de estas proteínas en hongos filamentosos.
- 10 En una realización, la activación de la ruta HOG se puede determinar mediante el análisis del estado de fosforilación de las proteínas Ypd1, Ssk1, Ssk2, Ssk22, Cdc42, Ste11, Ste 20, Ste50, Pbs2 y/o Hog1.
- En una realización de la invención, el inhibidor de la ruta HOG es un inhibidor de la proteína Ypd1, Ssk1, Ssk2, Ssk22, Cdc42, Ste11, Ste 20, Ste50, Pbs2 y/o Hog1.
- 15 En una realización, la ruta de señalización es la ruta UPR. La ruta UPR (en la que UPR significa respuesta de proteína desplegada) es una ruta de señalización de estrés implicada en el desarrollo celular y la adaptación ambiental en hongos. Esta ruta está más particularmente implicada en el mantenimiento de la homeostasis del retículo endoplásmico. Las proteínas de la ruta UPR incluyen, pero no se limitan a, la serina-treonina quinasa y la endoribonucleasa Ire1 (Inositol REquiring 1), el factor de transcripción Hac1 y los homólogos de estas proteínas en hongos filamentosos.
- 20 En una realización, la activación de la ruta UPR se puede determinar a través del análisis del empalme de las transcripciones de hacA y la inducción transcripcional de genes diana de UPR bien conocidos, tales como la chaperona Kar2 y la disulfuro de isomerasa Pdi1 de la proteína.
- En una realización de la invención, el inhibidor de la ruta UPR es un inhibidor de la serina-treonina quinasa y la endoribonucleasa Ire1 y/o el factor de transcripción Hac1.
- 25 En una realización, la cantidad no fungicida del agente potenciador es una cantidad del inhibidor en el que dicho producto no tiene ningún efecto fungistático cuando los hongos se cultivan en presencia de dicho agente potenciador durante 5 horas, preferiblemente 10 horas, más preferiblemente 20, 30 horas o más
- En otra realización, la cantidad no fungicida del agente potenciador es una cantidad del inhibidor en el que dicho producto tiene un efecto fungistático, pero inhibe el crecimiento de hongos en menos del 20% en comparación con los hongos de control cultivados sin el agente potenciador, cuando los hongos se cultivan en presencia de dicho agente potenciador durante 5 horas, preferiblemente 10 horas, más preferiblemente 20, 30 horas o más.
- 30 Los métodos para determinar la cantidad no fungicida de un compuesto son bien conocidos para los expertos en el arte. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, prueba de crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de dicho compuesto, que puede llevarse a cabo en medio líquido o sólido.
- 35 Preferiblemente, la cantidad no fungicida del agente potenciador se determina según la prueba A como se describió anteriormente.
- Según la invención, la cantidad de agente potenciador varía de 10 a 200 μ M, preferiblemente de 25 a 100 μ M.
- En una realización de la invención, el agente potenciador de una molécula de defensa de la planta es la queleritrina.
- 40 En una realización, dicho hongo patógeno se selecciona del grupo que comprende *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria dauci* y *Venturia inaequalis*.
- En una realización, los hongos fitopatógenos son patógenos de plantas que pertenecen al clado de angiospermas, preferiblemente al clado de Eudicots, más preferiblemente al clado de Rosids, incluso más preferiblemente al orden de Brassicales y aún más preferiblemente la familia de Brassicaceae, también conocida como familia Cruciferae. Los ejemplos de plantas de la familia Brassicaceae incluyen, pero no se limitan a, *Brassica carinata*, *Brassica juncea*, *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Brassica nigra* y *Brassica rapa*.
- 45 En una realización de la invención, los hongos fitopatógenos son patógenos de plantas seleccionadas de la lista que comprende plantas de la familia Brassicaceae, tales como, por ejemplo, *Brassica oleracea*; plantas de la familia Apiaceae, tal como, por ejemplo, *Daucus carota* subsp. *Sativus*; plantas de la familia Vitaceae, tales como, por ejemplo, *Vitis vinifera*; plantas de la familia Rosaceae, tales como, por ejemplo, *Malus domestica*.
- 50 Se dan ejemplos de hongos fitopatógenos para plantas específicas en la tabla 1.

Tabla 1

Planta	Hongos fitopatógenos
<i>Brassica oleracea</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>Sativus</i>	<i>Alternaria dauci</i>
<i>Vitis vinifera</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Malus domestica</i>	<i>Venturia inaequalis</i>

Según la invención, la molécula de defensa de la planta es una fitoalexina seleccionada de brasinina, camalexina, resveratrol, 3,5-dihidroxibifenilo, aucuparina y 6-metoximeleína.

5 Según una realización, la exposición a una molécula de defensa de la planta puede ser una exposición natural o artificial. Como se usa en este documento, una "exposición natural" se refiere a una exposición durante la infección, *in planta*. Bajo exposición natural, se puede producir una acumulación de la molécula de defensa de la planta como resultado de la infección fúngica, o como resultado de otros estímulos que desencadenan el sistema de defensa del órgano de la planta. Por el contrario, una "exposición artificial" se refiere a una exposición provocada a la molécula, por ejemplo en un medio de cultivo o mediante la aplicación de dicha molécula de defensa de la planta en un hongo o en un cultivo de hongos.

10 En la tabla 2 se muestran ejemplos de moléculas de defensa de plantas sintetizadas por las plantas seleccionadas.

Planta	Molécula de defensa de la planta
<i>Arabidopsis thaliana</i>	camalexina
<i>Brassica oleracea</i>	Brassinin
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>Sativus</i>	6-metoximeleína
<i>Vitis vinifera</i>	Resveratrol
<i>Malus domestica</i>	3,5-dihidroxibifenilo

15 En una realización, la activación de una ruta de señalización se determina después de la exposición natural a la molécula, por ejemplo, recolectando hongos de una planta infectada. Un ejemplo no limitante de un método para determinar la activación de una ruta de señalización después de la exposición natural a la molécula es inocular los órganos de la planta con dicho hongo, recolectar tejidos vegetales infectados que comprenden el hongo fitopatógeno y extraer cualquiera de las proteínas (para determinar la activación de la (s) ruta (s) CWI y/o HOG) o ARN (para determinar la activación de la ruta UPR) para el análisis del perfil de fosforilación o del perfil de expresión, respectivamente.

20 En otra realización, la activación de una ruta de señalización se determina después de la exposición artificial a la molécula, por ejemplo, agregando la molécula al medio de cultivo de un hongo cultivado y cosechando el hongo expuesto. Un ejemplo no limitativo de un método para determinar la activación de una ruta de señalización después de la exposición artificial a la molécula comprende agregar dicha molécula al medio de cultivo de un hongo cultivado, recolectar el hongo y extraer cualquiera de las proteínas (para determinar la activación de la(s) ruta(s) CWI y/o) o ARN (para determinar la activación de la ruta UPR) para el análisis del perfil de fosforilación o del perfil de expresión, respectivamente.

25 En una realización de la invención, dicha molécula de defensa de la planta está presente en la composición en una cantidad no fungicida.

30 En una realización, la cantidad no fungicida de la molécula de defensa de la planta es una cantidad de la molécula de defensa de la planta en la que dicha molécula no tiene ningún efecto fungistático cuando los hongos se cultivan en presencia de dicho agente potenciador durante 5 horas, preferiblemente 10 horas, más preferiblemente 20, 30 horas o más.

35 En otra realización, la cantidad no fungicida de la molécula de defensa de la planta es una cantidad de la molécula de defensa de la planta en la que dicho producto tiene un efecto fungicida, pero inhibe el crecimiento de hongos en menos del 20% en comparación con los hongos de control cultivados sin la molécula de defensa de la planta,

cuando los hongos se cultivan en presencia de dicho agente potenciador durante 5 horas, preferiblemente 10 horas, más preferiblemente 20, 30 horas o más.

5 Los métodos para determinar la cantidad no fungicida de una molécula de defensa de la planta son bien conocidos para los expertos en el arte. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, prueba de crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de dichos compuestos, que se pueden llevar a cabo en medio líquido o sólido. Preferiblemente, la cantidad no fungicida de una molécula de defensa de la planta se determina según la prueba A como se describió anteriormente.

Según la invención, la molécula de defensa de la planta es una fitoalexina seleccionada de brasinina, camalexina, resveratrol, 3,5-dihidroxibifenilo, aucuparina y 6-metoximeleína.

10 En una realización de la invención, la molécula de defensa de la planta presente en la composición es la misma que la molécula de defensa de la planta sintetizada por el órgano de la planta que se va a proteger por la composición de la invención. Preferiblemente, según esta realización, el agente potenciador de una molécula de defensa de la planta es un agente potenciador homólogo.

15 En otra realización de la invención, la molécula de defensa de la planta presente en la composición es diferente de la molécula de defensa de la planta sintetizada por el órgano de la planta que se va a proteger por la composición de la invención. De acuerdo con esta realización, el agente potenciador de una molécula de defensa de la planta puede ser un agente potenciador homólogo o heterólogo de una molécula de defensa de la planta.

20 En una realización, la composición de la invención comprende además un agente para estimular la producción de una molécula de defensa de la planta tal como, por ejemplo, fitoalexina, por un órgano de la planta; un insecticida y/o herbicida.

En una realización, dicho agente para estimular la producción de una molécula de defensa de la planta está presente en la composición en una cantidad no fungicida. Preferiblemente, dicha cantidad no fungicida se determina según la prueba A.

En una realización, la composición de la invención no comprende un fungicida en una cantidad fungicida.

25 En una realización de la invención, la composición de la invención consiste en una combinación de un agente potenciador homólogo de una molécula de defensa de la planta y un agente para estimular la producción de dicha molécula de defensa de la planta por el órgano de la planta que se va a proteger o tratar.

En una realización, la composición o el producto de la invención está en forma sólida, tal como, por ejemplo, gránulos, polvos humectables, gránulos o polvos dispersables en agua y similares.

30 En otra realización, la composición de la invención está en forma líquida, tal como, por ejemplo, una suspensión, una solución o una emulsión, tal como, por ejemplo, una emulsión aceite en agua o una emulsión agua en aceite.

En una realización, la composición de la invención se puede formular como un concentrado para ser diluido, tal como, por ejemplo, un concentrado soluble, un concentrado emulsionable y similares.

35 En una realización, la composición de la invención puede comprender agentes adicionales, tales como, por ejemplo, sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, portadores sólidos, surfactantes, agentes humectantes, adhesivos, espesantes o aglutinantes.

40 Los ejemplos de disolventes incluyen, pero no se limitan a, hidrocarburos aromáticos, tales como, por ejemplo, mezclas de xileno o naftalenos sustituidos; ftalatos, tales como, por ejemplo, ftalato de dibutilo o ftalato de dioctilo; hidrocarburos alifáticos, tales como, por ejemplo, ciclohexano o parafinas; alcoholes y glicoles y sus éteres y ésteres, tales como, por ejemplo, etanol, etilenglicol, etilenglicol monometil o monoetil éter; cetonas, tales como, por ejemplo, ciclohexanona; disolventes fuertemente polares, tales como, por ejemplo, N-metil-2-pirrolidona, dimetilsulfóxido o dimetilformamida; aceites vegetales o aceites vegetales epoxidados, tales como, por ejemplo, aceite de coco epoxidado o aceite de soja; y agua.

45 Los ejemplos de portadores sólidos incluyen, pero no se limitan a, cargas minerales naturales, tales como, por ejemplo, calcita, talco, caolín, montmorillonita o atapulgita; ácido silícico altamente disperso o polímeros absorbentes altamente dispersos; piedra pómez, ladrillo roto, sepiolita o bentonita; calcita o arena; dolomita o residuos de plantas pulverizadas.

50 Los ejemplos de surfactantes incluyen, pero no se limitan a, surfactantes aniónicos que incluyen; sales de ácido alquilsulfosuccínico, sales de ácido fosfato condensado, sales de ácido alquilbencenosulfónico tales como, por ejemplo, sal de sodio de ácido dodecibencenosulfónico, sales de ácido alquilnaftalenosulfónico, condensados de formalina de sales de ácido naftalenosulfónico, sales de ácido ligninsulfónico, sales de ácido policarboxílico, sales de ácido alquilétersulfúrico, sales de ácido polioxietilen-alquilarilfeniléter-sulfúrico, sales de ácido polioxietilen-alquilariléter-sulfúrico, sales de ácido de polioxietilen-alquilarilsulfúrico, sales de éster de polioxietilen-

- alquilarilétersulfato, sales del ácido polioxietilen-alquiléteracetato-éster-sulfúrico; surfactantes no iónicos tales como, por ejemplo, polioxietilen-alquiléter, polioxietileno-alquilariléter, polioxietilen-alquilarilfeniléter, polioxietilen-estirilfenileter, polioxietilen-alquil éster, sorbitan-alquil-éster, polioxietilen-sorbitanalquil-éster y polioxietilen-polioxipropilenglicol. Como se usa en este documento, la forma de sal incluye sales de metales alcalinos, sales de amonio y sales de amina.
- 5 La presente invención también se refiere a una composición de recubrimiento, revestimiento o de formación de pellas que comprende o que consiste en una composición como se describe anteriormente en este documento.
- La presente invención también se refiere a una composición que comprende o que consiste en una composición como se describe anteriormente en este documento para su uso para recubrir, revestir o dar forma de pellas un
- 10 órgano de la planta, preferiblemente una semilla.
- La presente invención también se refiere al uso de una composición como se describió anteriormente en este documento para recubrir, revestir o dar forma de pellas un órgano de la planta, preferiblemente una semilla.
- La presente invención también se refiere a un órgano de la planta recubierto, revestido o en forma de pellas, preferiblemente una semilla recubierta, revestida o en forma de pellas, en la que dicho recubrimiento, vendaje o en
- 15 forma de pellas comprende o consiste en o consiste esencialmente en una composición según la invención.
- En una realización, la composición de recubrimiento, revestimiento o de formación de pellas comprende o consiste en o consiste esencialmente en un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta combinada con dicha molécula de defensa de la planta. En una realización, el órgano de la planta recubierto, revestido o en forma de pellas, preferiblemente semilla, está recubierto, revestido o en forma de pellas con una composición que
- 20 comprende o que consiste en o consiste esencialmente en un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta combinada con dicha molécula de defensa de la planta.
- La presente invención también se refiere a un método para prevenir, controlar o tratar una infección fúngica en un órgano de la planta que comprende aplicar en dicho órgano de la planta la composición según la invención. Preferiblemente, se aplica una cantidad fitofarmacéuticamente eficaz de dicha composición sobre el órgano de la
- 25 planta.
- La presente invención también se refiere a una composición como se describe anteriormente en este documento para, o para su uso en, prevenir, controlar o tratar una infección fúngica en un órgano de la planta, en la que dicha composición, preferiblemente una cantidad fitofarmacéuticamente eficaz de dicha composición, se aplica en dicho órgano de la planta.
- 30 La presente invención también se refiere al uso de una composición como se describe anteriormente en este documento para prevenir, controlar o tratar una infección fúngica en un órgano de la planta, en la que dicha composición, preferiblemente una cantidad fitofarmacéuticamente eficaz de dicha composición, se aplica a dicho órgano de la planta.
- La presente invención también se refiere a un método para prevenir, controlar o tratar una infección fúngica en un
- 35 órgano de la planta que comprende aplicar a dicho órgano de la planta una cantidad no fungicida o una cantidad potenciadora de una composición que comprende un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta, en asociación con un vehículo fitofarmacéutico.
- La presente invención también se refiere a un método para prevenir, controlar o tratar los daños causados por una infección fúngica en un órgano de la planta que comprende aplicar sobre dicho órgano de la planta la composición según la invención. Preferiblemente, se aplica una cantidad fitofarmacéuticamente eficaz de dicha composición o
- 40 producto de la invención sobre el órgano de la planta.
- Los ejemplos de daños causados por una infección fúngica en un órgano de la planta incluyen, pero no se limitan a, necrosis, marchitez, podredumbre, mal de los semilleros.
- La presente invención también se refiere a una composición como se describe en este documento anteriormente para, o para uso en, prevenir, controlar o tratar daños causados por una infección fúngica en un órgano de la planta, en el que dicha composición, preferiblemente una cantidad fitofarmacéuticamente eficaz de dicha composición, se aplica sobre dicho órgano de la planta.
- 45 La presente invención también se refiere al uso de una composición como se describe anteriormente en este documento para prevenir, controlar o tratar daños causados por una infección fúngica en un órgano de la planta, en el que dicha composición, preferiblemente una cantidad fitofarmacéuticamente eficaz de dicha composición, se aplica en dicho órgano de la planta.
- 50 Sin estar dispuestos a limitarse a una teoría, los inventores sugieren que al prevenir, controlar y/o tratar las infecciones por hongos, la composición o producto de la invención permite una disminución de la parte del metabolismo de la planta dedicada a la lucha contra dichas infecciones fúngicas.

En una realización, en los métodos de la invención como se describe anteriormente en este documento, la aplicación de la composición de la invención en dicho órgano de la planta se lleva a cabo mediante aplicación foliar, empapado, pulverización, atomización, espolvorear, dispersión, recubrimiento o vertido.

5 En una realización de la invención, el agente potenciador de una molécula de defensa de la planta está presente en la composición en una cantidad potenciadora. En una realización, los métodos de la invención descritos anteriormente en este documento comprenden la aplicación de una cantidad potenciadora del agente potenciador en dicho órgano de la planta.

10 Los métodos para determinar la cantidad potenciadora del agente potenciador son bien conocidos para los expertos en el arte. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, prueba de crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de dichos compuestos, que se pueden llevar a cabo en medio líquido o sólido. Preferiblemente, la cantidad potenciadora del agente potenciador se determina según la prueba B como se describió anteriormente.

Las composiciones de la invención presentan las siguientes ventajas:

15 - En una realización, la composición de la invención permite una disminución de la cantidad de fungicidas que se usarán para luchar contra una infección fúngica, como cantidades no fungicidas de agentes potenciadores de moléculas de defensa de plantas, de moléculas de defensa de plantas, de insecticida, de herbicida y de agentes para estimular la síntesis de una molécula de defensa de la planta están presentes en la composición de la invención.

20 - En una realización, la composición de la invención se puede usar para la destrucción de hongos in situ, esto es, cuando dichos hongos están atacando un órgano de la planta de interés. Dicha realización se aplica, por ejemplo, cuando el agente potenciador es un agente potenciador homólogo. La composición de la invención es, de este modo, selectiva de hongos que atacan un órgano de la planta de interés.

25 - En otra realización, la composición de la invención es fungicida en cualquier situación, esto es, cuando los hongos están atacando un órgano de la planta o no. Dicha realización se aplica, por ejemplo, cuando la composición de la invención comprende una molécula de defensa de la planta y un agente potenciador de dicha molécula de defensa de la planta.

30 - En una realización, la composición se puede adaptar a una situación particular de ataque de un órgano de la planta particular por un hongo particular. De acuerdo con esta realización, el inhibidor puede ser específico de dicho hongo particular. Aún según esta realización, la molécula de defensa de la planta, o el agente para estimular la producción de una molécula de defensa de la planta puede ser específica del órgano de la planta atacado.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una curva de crecimiento que describe el efecto del aumento de las concentraciones de queleritrina en *Alternaria brassicicola*.

35 La figura 2 es una curva de crecimiento que describe el efecto del aumento de las concentraciones de camalexina en *Alternaria brassicicola*.

La figura 3 es una curva de crecimiento que muestra el efecto sinérgico de 25 μM de queleritrina y de 10 μM de camalexina sobre el crecimiento de *Alternaria brassicicola*.

40 La figura 4 es una combinación de imágenes de hojas de col (*Brassica oleracea* cv *Bartolo*) inoculadas con *Alternaria brassicicola*, y tratadas con una solución de control o con la composición de la invención, como se indica en el Panel C. (A) hojas sin lesiones. (B) hojas con lesiones.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. En estos ejemplos, la espectrometría se realizó usando el dispositivo nano SPECTROstar comercializado por BMG LABTECH.

Ejemplo 1: Determinación de la cantidad potenciadora de queleritrina

45 a) Determinación *in vitro* de la cantidad no fungicida de queleritrina

Se cultivaron cepas de *Alternaria brassicicola* a 24°C en medio de patata dextrosa (PD) (Cat. No. 213200; Becton Dickinson, USA).

50 Para la preparación del inóculo, se recogieron conidios de cultivos sólidos de 8 días mediante la adición de caldo PD seguido de un raspado suave de las placas de agar. Se contaron en la cámara de Thoma y las suspensiones conidiales se diluyeron a la concentración de 10^5 conidios/mL.

- 5 El crecimiento se registró automáticamente durante al menos 30 horas a 25°C usando un lector nefelométrico (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Alemania) equipado con un láser de 635 nm como fuente de radiación. Durante la incubación, las placas de 96 pocillos se sometieron a agitación a 175 rpm durante 5 minutos cada 10 minutos. Las mediciones se realizaron cada hora con un valor de ganancia de 90 y un porcentaje del valor máximo del 20%. Cada pocillo se midió durante 0.1 segundos con un rayo láser de 2.5 mm.
- Se agregaron queleritrina (25 μ M o 50 μ M, pocillos de prueba) o 10 μ L de DMSO (disolvente de queleritrina, pocillos de control) en los pocillos, y se dibujaron curvas de crecimiento (Figura 1).
- Como se muestra en la figura 1, una concentración de 25 μ M de queleritrina no inhibe el crecimiento de *Alternaria brassicicola*. Dicha concentración corresponde de este modo a una cantidad no fungicida.
- 10 b) Determinación *in vitro* de la cantidad no fungicida de camalexina
- El crecimiento de *Alternaria brassicicola* se midió como se describe en el ejemplo 1a.
- Se agregaron camalexina (10, 20, 40 o 60 μ M, pocillos de prueba) o 10 μ L de DMSO (disolvente de queleritrina, pocillos de control) en los pocillos, y se dibujaron curvas de crecimiento (Figura 2).
- 15 Como se muestra en la figura 2, las concentraciones de 10 y 20 μ M de camalexina no inhiben el crecimiento de *Alternaria brassicicola* en más del 20%. Dichas concentraciones corresponden de este modo a cantidades no fungicidas.
- c) Determinación *in vitro* de la cantidad potenciadora de queleritrina
- El efecto potenciador de la queleritrina se mide en una suspensión de conidios tratados con una molécula de defensa de la planta, camalexina, que está presente en una cantidad no fungicida como se determinó anteriormente.
- 20 Dicha cantidad no fungicida es consistente con la cantidad de camalexina producida por un órgano de la planta infectado.
- El crecimiento de *Alternaria brassicicola* se midió como se describe anteriormente.
- Se agrega una cantidad no fungicida de queleritrina (como se determina en el ejemplo 1a) y/o una cantidad no fungicida de camalexina (como se determina en el ejemplo 1b) o 10 μ L de DMSO por pocillo, y se dibujan curvas de crecimiento (Figura 3).
- 25 Como se muestra en la figura 3, se muestra un sorprendente efecto sinérgico, que es un efecto potenciador, sobre el crecimiento de *Alternaria brassicicola*. De hecho, la combinación de una cantidad no fungicida de queleritrina y de una cantidad no fungicida de camalexina conduce a una inhibición drástica del crecimiento de *Alternaria brassicicola*. La concentración de 25 μ M de queleritrina es, de este modo, una cantidad potenciadora.
- 30 Ejemplo 2: efecto *in vivo* de la composición de la invención
- El ejemplo 2 describe un protocolo para determinar la eficacia *in vivo* de la composición de la invención, que comprende una cantidad potenciadora de queleritrina (25 μ M), como se determina en el ejemplo 1.
- Se inocularon gotas de 5 μ L de suspensión de conidios de *Alternaria brassicicola* (10^5 a 10^3 conidios/mL) en hojas intactas o prelesionadas (esto es, en la que la síntesis de moléculas de defensa de plantas como Brassinin fue desencadenada naturalmente por la agresión) de plantas de *B. oleracea cv Bartolo* en las etapas 4-6 hojas por planta. Los inóculos se depositaron simétricamente en los lados izquierdo y derecho desde la vena central: los inóculos que comprenden 25 μ M de queleritrina se depositaron en el lado derecho, y los inóculos que comprenden DMSO se depositaron en el lado izquierdo. Las plantas se mantuvieron luego bajo humedad de saturación (100% de humedad relativa). Se observaron síntomas el día 6 después de la infección (6 dpi).
- 35 Como se muestra en la figura 4, la composición de la invención limita *in vivo* la infección fúngica de las hojas de col.
- Ejemplo 3: Determinación *in vivo* de la inhibición de PKC por queleritrina
- 1- Prueba C de la invención
- Construcción de una cepa de *S. cerevisiae* que sobreexpresa *Alternaria brassicicola* Pkc1
- 45 El ADNc que codifica el gen Pkc1 de *Alternaria brassicicola* (<http://genome.jgipsf.org/Altbr1/Altbr1.home.html>; secuencia ref : AB07449.1) se amplificó por PCR y se clonó en un vector pYES2-CT (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). El vector resultante (pYES-PKC) se insertó en una cepa BY4743 de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Monitoreo del crecimiento

5 El crecimiento de esta cepa se controló en un medio inductor (medio libre de uracilo GS suplementado con galactosa) en presencia de concentraciones crecientes de queleritrina (0, 25, 50 o 75 μM), y se comparó con el crecimiento de un control cepa (cepa BY4743 transformada con el vector pYES2-CT vacío). El crecimiento se midió por espectrometría (densidad óptica: 600 nm). La inhibición del crecimiento se evaluó mediante la comparación del área bajo las curvas.

Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Condición (concentración de queleritrina)	Área bajo la curva	Inhibición
pYES2-CT	15,1	---
pYES2-CT (25 μM)	8,6	43%
pYES2-CT (50 μM)	3,2	79%
pYES2-CT (75 μM)	2,5	84%
pYES2-PKC	12,6	---
pYES2-PKC (25 μM)	10,7	15%
pYES2-PKC 50 (50 μM)	9,4	25%
pYES2-PKC 75 (75 μM)	8,8	30%

10 La queleritrina inhibe el crecimiento de cepas que expresan niveles normales de Pkc1. La inhibición es menos eficiente en las células que sobreexpresan Pkc1. Por lo tanto, la queleritrina probablemente es un inhibidor de Pkc1.

2- Prueba D de la invención.

15 El crecimiento de una cepa BY4743 de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio SD líquido que comprende concentraciones crecientes de queleritrina (0, 10, 15, 20 o 25 μM) se controló y comparó con el crecimiento de la misma cepa en un medio SD líquido que contiene 1M de sorbitol (condiciones de alta presión osmótica) en presencia de concentraciones crecientes de queleritrina.

El crecimiento se midió por espectrometría (densidad óptica: 600 nm). La inhibición del crecimiento se evaluó mediante la comparación del área bajo las curvas. Los resultados se muestran en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Medio	Concentración de queleritrina (μM)	Área bajo la curva	Inhibición (%)
SD	0	15.7	---
	10	14.3	10
	15	11.8	26
	20	10.4	35
	25	8.1	49
SD + Sorbitol	0	5.0	---
	10	5.2	-3
	15	5.0	1
	20	2.0	0

La queleritrina inhibe el crecimiento de una cepa de tipo salvaje en condiciones normales de presión osmótica, pero no en condiciones de alta presión osmótica. Este resultado parece confirmar la acción inhibitoria de la queleritrina en Pkc.

5 Ejemplo 4: Compuestos de tríadas/moléculas de defensa de la planta/hongo fitopatógeno

En la tabla 5 a continuación se muestran compuestos (columna 1) que tienen un efecto potenciador de una molécula de defensa de la planta (columna 2) para la inhibición de un hongo patógeno (columna 3). El tipo del agente potenciador en esta situación particular se da en la columna 4 (homólogo o heterólogo). Las tríadas se identificaron según la prueba B.

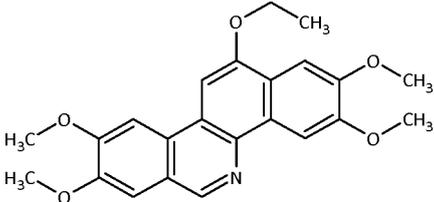
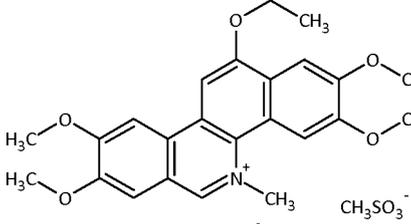
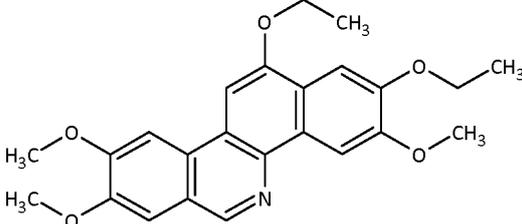
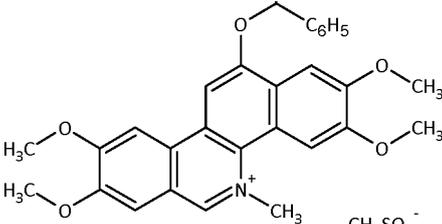
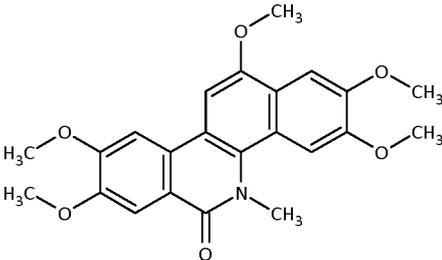
10

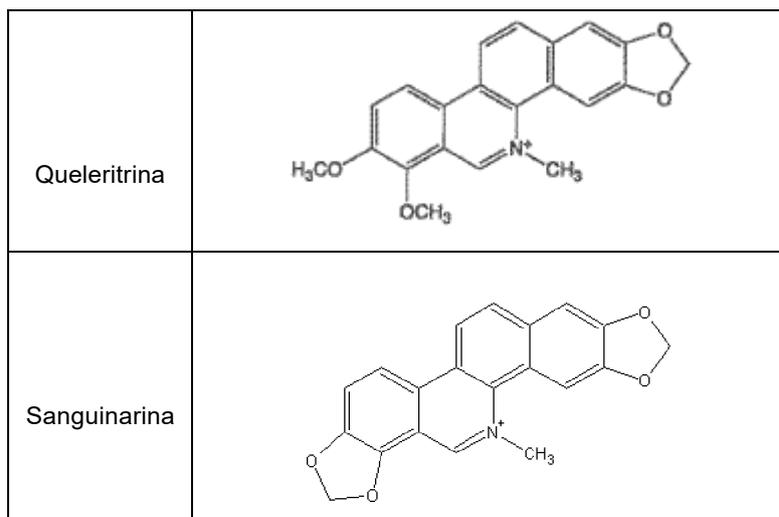
Tabla 5

Compuesto	Molécula de defensa de la planta	Hongo fitopatógeno	Tipo de agente potenciador
1	Resveratrol	<i>Alternaria brassicicola</i>	Heterólogo
2	Brassinin	<i>Alternaria brassicicola</i>	Homólogo
	Brassinin	<i>Botrytis cinerea</i>	Homólogo
	Camalexina	<i>Botrytis cinerea</i>	Homólogo
	6-metoximeleína	<i>Alternaria dauci</i>	Homólogo
3	Resveratrol	<i>Alternaria brassicicola</i>	Heterólogo
4	Brassinin	<i>Alternaria brassicicola</i>	Homólogo
	Resveratrol	<i>Alternaria brassicicola</i>	Heterólogo
5	Brassinin	<i>Alternaria brassicicola</i>	Homólogo
	Resveratrol	<i>Alternaria brassicicola</i>	Heterólogo
Queleritrina	Brassinin	<i>Alternaria brassicicola</i>	Homólogo
	Camalexina	<i>Alternaria brassicicola</i>	Homólogo

REIVINDICACIONES

1. Un método para prevenir, controlar o tratar una infección fúngica en un órgano de la planta que comprende aplicar a dicho órgano de la planta una composición que comprende un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta seleccionada entre:

Compuesto	Estructura
1	
2	
3	
4	
5	



en asociación con un vehículo fitofarmacéutico,

en el que:

el agente potenciador está en una cantidad que varía desde 10 a 200 μM ; y

- 5 La molécula de defensa de la planta es una molécula seleccionada de brasinina, camalexina, resveratrol, 3,5-dihidroxibifenilo, aucuparina y 6-metoximeleína, y que pertenece al sistema inmune de la planta y se usa por un órgano de la planta para resistir a una infección fúngica.
 2. El método según la reivindicación 1, en el que la cantidad del agente potenciador está en una cantidad que varía desde 25 a 100 μM .
- 10 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha infección fúngica es una infección por un hongo fitopatógeno.
 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el órgano de la planta se selecciona de la lista que comprende la familia Brassicaceae; familia Apiaceae; familia Vitaceae; y la familia Rosaceae.
 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que
 - 15 - dicho órgano de la planta es *Brassica oleracea*;
 - dicha infección fúngica es una infección por *Alternaria brassicicola*; y
 - dicho agente potenciador de una molécula de defensa de la planta es la quelerritrina.
 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho agente potenciador de una molécula de defensa de la planta es la sanguinarina.
- 20 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho agente potenciador de una molécula de defensa de la planta es la quelerritrina.
 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la composición comprende además una molécula de defensa de la planta seleccionada entre brasinina, camalexina, resveratrol, 3,5-dihidroxibifenilo, aucuparina y 6-metoximeleína.
- 25 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición comprende además un agente para estimular la síntesis de una molécula de defensa de la planta, un insecticida y/o un herbicida.
 10. Uso de una composición fitosanitaria que comprende un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en una cantidad que varía desde 10 a 200 μM , en asociación con un vehículo fitofarmacéutico, para proteger una planta o un cultivo contra una infección fúngica.
- 30 11. Una composición que comprende un agente potenciador de una molécula de defensa de la planta como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en una cantidad que varía desde 10 a 200 μM y una

molécula de defensa de la planta seleccionada de brasinina, camalexina, resveratrol, 3,5-dihidroxibifenilo, aucuparina y 6-metoximeleína.

12. La composición según la reivindicación 11, en la que el agente potenciador de una molécula de defensa de la planta está en una cantidad que varía desde 25 a 100 μ M.

5 13. Una composición fitosanitaria o fitofarmacéutica que comprende la composición según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en asociación con un vehículo fitofarmacéutico.

14. Una composición de recubrimiento, revestimiento o de formación de pellas que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.

15. Una semilla recubierta, revestida o en forma de pellas con la composición según la reivindicación 14.

10

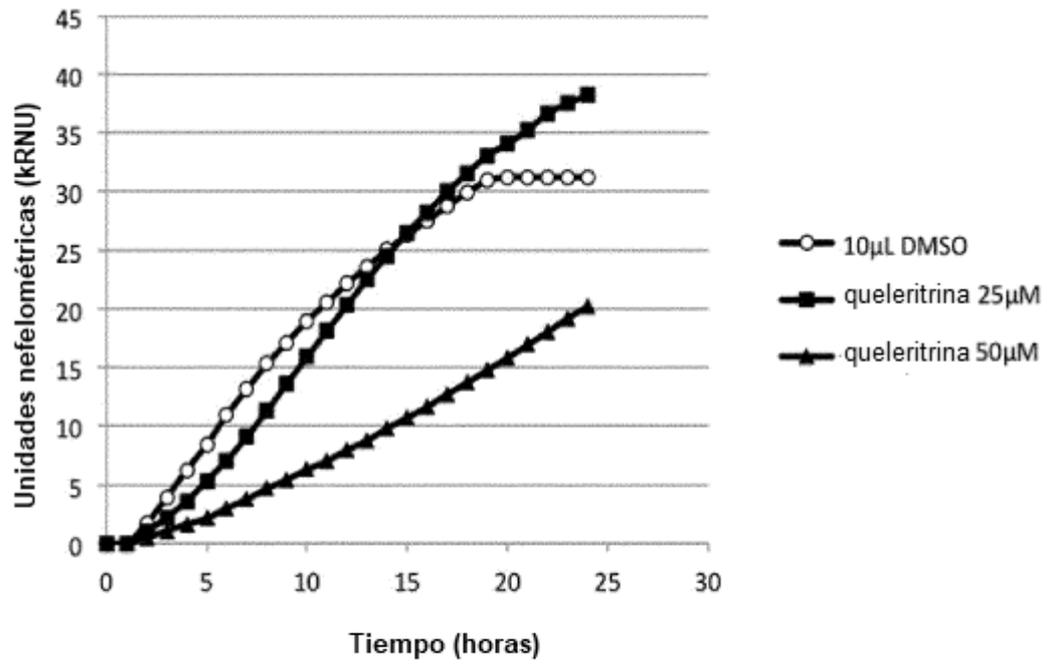


FIG. 1

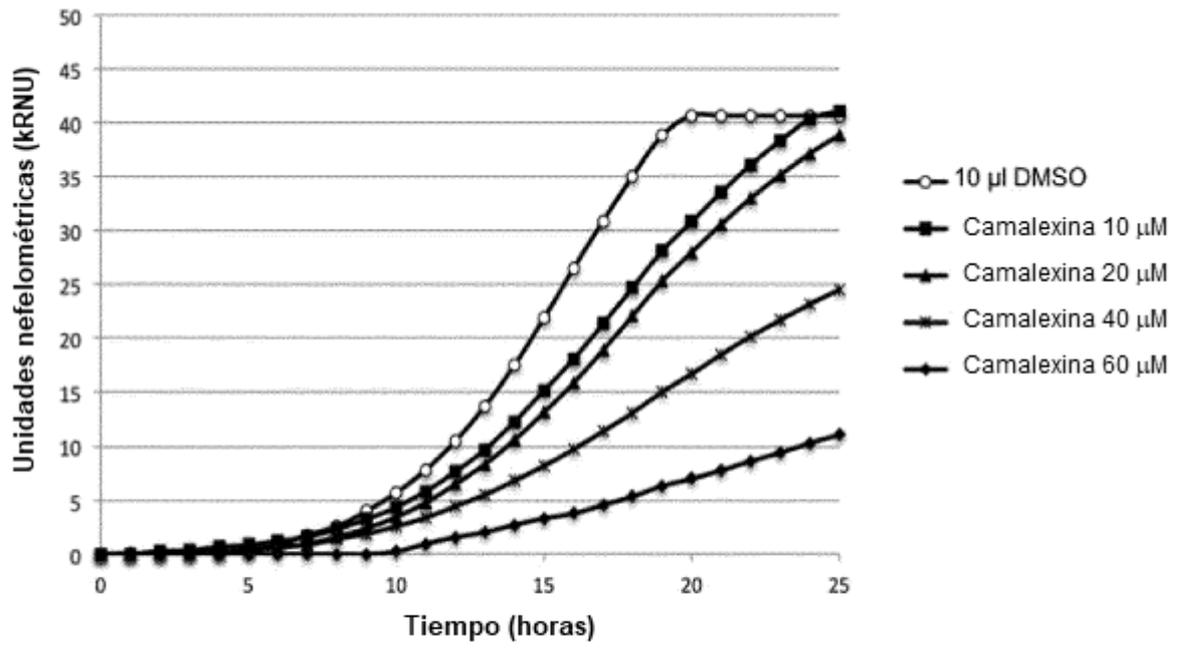


FIG. 2

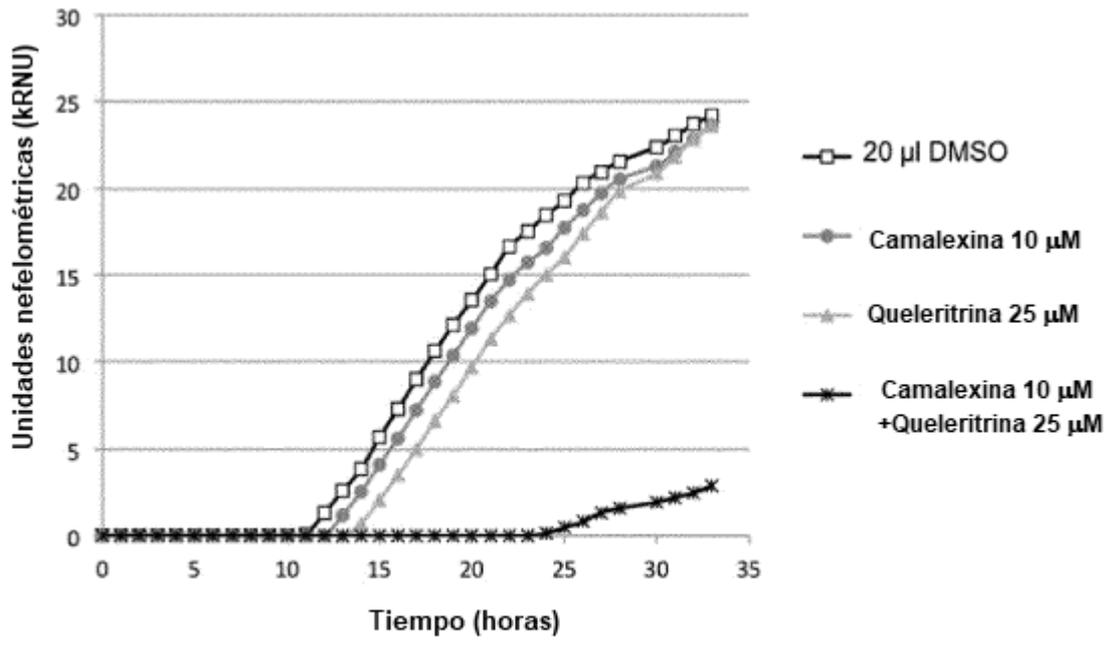


FIG. 3

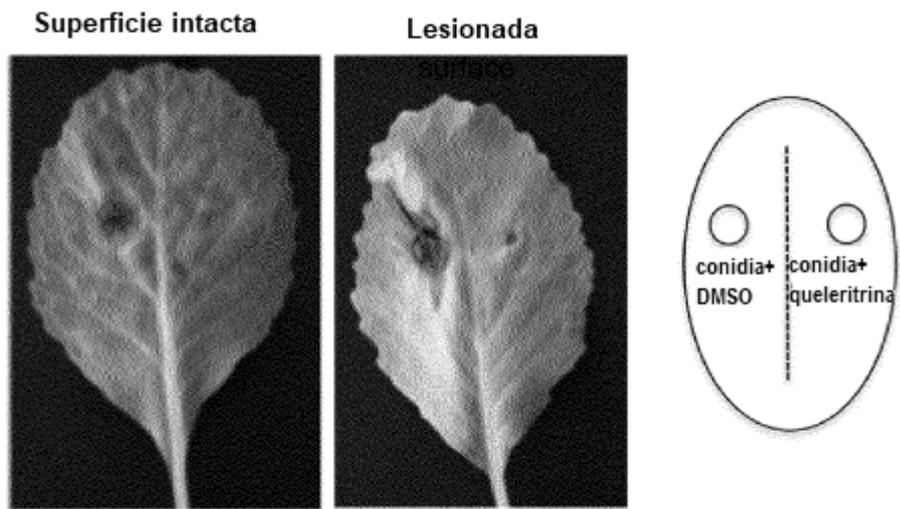


FIG. 4