

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 505**

51 Int. Cl.:

A01N 63/02 (2006.01)

A01G 7/00 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A01N 37/44 (2006.01)

A01N 37/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2012 PCT/JP2012/075542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13065439**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2012 E 12846612 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 2781157**

54 Título: **Método de inhibición de infecciones causadas por fitovirus**

30 Prioridad:

01.11.2011 JP 2011239948

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

15.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TOMITA, REIKO;
KADOTANI, NAOKI y
SEKINE, KENTARO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 782 505 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

Método de inhibición de infecciones causadas por fitovirus

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para inhibir infecciones causadas por fitovirus. La presente invención es útil en los campos de la agricultura, horticultura, y etcétera.

10 **Técnica anterior**

Los gérmenes patógenos que causan enfermedades de las plantas se dividen aproximadamente en tres tipos, es decir, hongos filamentosos (mohos), bacterias y virus.

15 La mayor parte de los tipos de las enfermedades de las plantas está constituida por los causados por hongos filamentosos, que son eucariotas, y que constituyen el 73 % de las causas de todas las enfermedades de las plantas. Sin embargo, los hongos filamentosos tienen estructuras celulares, ciclos de vida, etc. significativamente diferentes a los de plantas y animales, y es fácil desarrollar productos químicos agrícolas de manera selectiva y muy eficaz contra hongos filamentosos específicos. En cambio, aunque las virosis (enfermedades víricas) constituyen
20 solo aproximadamente del 5 al 7 % de las causas de las enfermedades de las plantas, estos patógenos están constituidos por ácidos nucleicos y proteínas, que son sustancias básicas para la vida, virus que proliferan utilizando los mecanismos de replicación, transcripción y traducción de plantas hospedadoras, y por lo tanto, es extremadamente difícil desarrollar una sustancia que inactive de manera selectiva o específica un virus determinado. Por consiguiente, se considera que, generalmente, es difícil controlar la virosis, y una vez desarrollada, no puede
25 curarse, y si no se toman medidas, sirve como una nueva fuente de infección y causa una mayor propagación de la enfermedad. Aunque ha habido muchos intentos para controlar las virosis, tales como bloquear la vía de infección utilizando un pesticida o similar, la eliminación de una planta que padece una enfermedad en una etapa temprana de la enfermedad y el mejoramiento de una planta utilizando un gen de resistencia, interferencia de ARN o similar (creación de recombinante genético), en realidad, actualmente sigue siendo muy difícil controlar las virosis.

30 Para controlar las enfermedades de las plantas, la clasificación o identificación de virus patógenos a nivel de género o especie es extremadamente importante. Esto se debe a que, para virus del mismo género o especie, se puede contemplar la analogía del vector o las características de los virus y, por lo tanto, es posible elegir un método para controlar las virosis o tomar medidas contra ellas hasta cierto grado.

35 Como uno de los métodos que se ponen en práctica para controlar las virosis, se puede poner como ejemplo el método de utilización de la acción interferencial de los virus. La acción interferencial se refiere a un fenómeno en el que una planta infectada con un virus determinado está protegida de la infección secundaria del virus. El desarrollo de virus atenuados también avanza (documento de patente 1), y las plántulas inoculadas previamente con CMV atenuado se comercializan parcialmente. Sin embargo, el inconveniente grave de este método es que solo es eficaz
40 para virus estrechamente relacionados que muestran una alta homología de sus secuencias de ácido nucleico.

Hasta la fecha, se ha citado una pluralidad de sustancias que muestran efecto antivírico. Por ejemplo, se han citado muchas sustancias, tales como los polisacáridos producidos por la cepa T1 de *Candida famata* o un mutante de la
45 misma (documento de patente 2), proteínas derivadas de *Phytolacca americana* (documento de patente 3), polisacáridos ácidos de alto peso molecular producidos por basidiomicetos pertenecientes al género *Fomes* (documento de patente 4), polisacáridos de alto peso molecular producidos en cultivo de hongos de *Schizophyllum* (documento de patente 5), alquil dietilentriaminoacetatos y sus sales (documento de patente 6), saponina (documento de patente 7) y polilisina (documento de patente 8) de *Camellia sinensis*, sin embargo, no se han
50 extendido ampliamente en la actualidad.

Actualmente, solo un tipo de agente antivírico, Lentemin (marca comercial de Noda Shokukin Kogyo Co., Ltd.), está registrado como producto químico agrícola en Japón (números de registro de productos químicos agrícolas, 15584, 17774, 19439 y 19440), a excepción de virus atenuados y desinfectantes de suelos. El ingrediente principal de
55 Lentemin son los componentes de extracción del medio de cultivo de un micelio de hongo Shitake producido cultivando micelios de hongo Shitake en un medio sólido, triturando el medio en el que se propaga el micelio en todo el medio, y sometiendo todo el medio a extracción. Probablemente por esta razón, su precio por unidad de volumen es relativamente caro. Además, para controlar la virosis del mosaico, la tasa de dilución recomendada de la solución de Lentemin es tan baja como 1 a 10 veces (documento no de patente 1) y, por lo tanto, el coste necesario para su rociado por unidad de superficie de cultivo también es extremadamente más alto en comparación con otros
60 productos químicos agrícolas habituales.

Se conoce un inhibidor de infecciones causadas por virus que contiene una solución obtenida mediante un
65 tratamiento térmico de células microbianas en condiciones ácidas (documento de patente 9), y en este documento se describe su efecto inhibidor de infecciones contra virus (virus del enanismo del trigo y de la cebada, virus del mosaico de la soja, virus del mosaico de la alfalfa, virus del enrollamiento de la hoja de la patata). Sin embargo, la

inhibición de infecciones causadas por virus de los géneros *Tobamovirus* y *Cucumovirus* con este inhibidor, se desconoce.

5 Por otro lado, se conoce un método de control de enfermedades causadas por microbios fitopatógenos (hongos filamentosos patógenos) que comprende rociar sobre las plantas un líquido de fermentación de aminoácidos, específicamente, un líquido de fermentación de prolina (documento de patente 10).

10 El documento no de patente 2 describe el efecto de la alanina, serina y ácido glutámico sobre la multiplicación del virus del mosaico del tabaco en la planta del tabaco. El documento de patente 11 describe métodos para aumentar la productividad de las plantas utilizando ácido glutámico y ácido glicólico. Los autores informan que las composiciones pueden utilizarse en diversas aplicaciones específicas, incluso para aumentar la resistencia a la infección por virus. Sin embargo, no se conoce ningún efecto de los líquidos derivados de la fermentación de aminoácidos para controlar las virosis.

15 Referencias de la técnica anterior

Documentos de patente

20 Documento de patente 1: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) N.º 1-281079
 Documento de patente 2: Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 2001-72521
 Documento de patente 3: Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 5-137580
 Documento de patente 4: Publicación de patente japonesa (Kokoku) N.º 6-21122
 Documento de patente 5: Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 1-272509
 Documento de patente 6: Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 2-121903
 25 Documento de patente 7: Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 7-25718
 Documento de patente 8: Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 63-2901
 Documento de patente 9: Publicación de patente internacional WO2009/88074
 Documento de patente 10: Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 6-80530
 Documento de patente 11: Publicación de patente internacional WO 01/82698

30 Documento no de patente

Documento no de patente 1: Yoneyama et al., Noyaku Binran (Agricultural Chemical Handbook), 10ª edición, págs. 387-389, Rural Culture Association Japan
 35 Documento no de patente 2: Varma y Verma, Journal of Phytopathology, vol. 58, n.º 1, págs. 53-58

Divulgación de la invención

Objetivo a lograr con la invención

40 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un inhibidor de infecciones causadas por virus que sea eficaz y asequible para reducir el riesgo de fitovirosis, cuyo control es convencionalmente difícil.

Medios para lograr el objetivo

45 Los inventores de la presente invención llevaron a cabo diversas investigaciones para desarrollar un inhibidor de infecciones causadas por fitovirus y, sorprendentemente, descubrieron que los líquidos derivados de la fermentación tenían un efecto inhibidor de infecciones causadas por virus. Aunque la aplicación de los líquidos derivados de la fermentación también mejoró la resistencia contra virus en tejidos vegetales a los que no se aplicaron directamente los líquidos, se observaron efectos inhibidores extremadamente fuertes de infecciones causadas por virus en las regiones a las que se aplicaron directamente los líquidos derivados de la fermentación. Es decir, el inhibidor de infecciones causadas por virus usado en la presente invención puede inducir resistencia a enfermedades en plantas, y además, aplicándolo directamente sobre las superficies de las plantas, la infección causada por virus puede reducirse. La presente invención se realizó basándose en estos hallazgos.

55 La presente invención se refiere a lo siguiente.

(1) Un método de inhibición de infección de una planta seleccionada de tabaco, tomate, pimiento y guindilla, por un virus seleccionado de un virus de los géneros *Tobamovirus* y *Cucumovirus*, comprendiendo el método:

60 (i) cultivar un microorganismo perteneciente a los géneros *Corynebacterium*, *Pantoea* o *Escherichia* en un medio que contenga una fuente de azúcar, una fuente de nitrógeno y nutrientes;
 (ii) disminuir el pH del medio después de finalizar el cultivo usando un ácido mineral y eliminar el aminoácido precipitado para producir un medio que tenga una concentración de al menos 1 mM de un aminoácido seleccionado de treonina o ácido glutámico;
 65 (iii) someter el medio a una concentración o a un tratamiento térmico para producir un líquido derivado de la

fermentación;

(iv) fabricar un inhibidor de infecciones causadas por virus que contenga el derivado de la fermentación de aminoácidos a una concentración del 0,01 al 10 % (v/v) en términos de concentración de líquido derivado de la fermentación de aminoácidos;

5 (v) rociar sobre la planta el inhibidor de infecciones causadas por virus.

(2) El método mencionado anteriormente, en donde la concentración del aminoácido en el medio después de eliminar el aminoácido precipitado es de 5 mM o mayor.

10 (3) El método mencionado anteriormente, en donde el virus del género *Tobamovirus* es el virus del moteado leve del pimiento, el virus del mosaico del tabaco o el virus del mosaico del tomate, y el virus del género *Cucumovirus* es el virus del mosaico del pepino.

(4) El método mencionado anteriormente, en donde el inhibidor de infecciones causadas por virus se rocía 1 a 10 días antes de un día en el que se espera que se produzca la infección causada por virus.

15 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el efecto de rociar en plantas de tabaco un líquido derivado de la fermentación de ácido glutámico para inhibir la infección del virus del mosaico del pepino (las fotografías muestran la morfología de la planta). Los valores numéricos (0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1,0 %) que se muestran en la parte superior de las hojas inoculadas y de las hojas superiores no inoculadas indican concentraciones de los líquidos derivados de la fermentación de aminoácidos utilizados para el tratamiento (dpi: días posteriores a la inoculación, número de días después de la inoculación, lo mismo se aplicará a los siguientes dibujos).

20 La figura 2 muestra el efecto de rociar con un líquido derivado de la fermentación del ácido glutámico para retrasar la virosis del mosaico del pepino (las fotografías muestran la morfología de la planta). Se muestran plantas de tabaco aproximadamente un mes después de haber sido inoculadas con el virus del mosaico del pepino.

La figura 3 muestra el efecto de rociar con un líquido derivado de la fermentación del ácido glutámico para inhibir en plantas de tabaco la infección del virus del mosaico del tabaco (las fotografías muestran la morfología de la planta). Los valores numéricos que se muestran en la parte superior de las hojas inoculadas indican concentraciones de los líquidos derivados de la fermentación de aminoácidos utilizados para el tratamiento.

30 La figura 4 muestra el efecto de rociar directamente con un líquido derivado de la fermentación del ácido glutámico (las fotografías muestran la morfología de la planta). El esquema de tratamiento que utiliza el derivado de la fermentación se muestra con un diagrama esquemático. Se observa un marcado efecto de inhibición de la infección causada por virus en las regiones tratadas con el líquido derivado de la fermentación (una inoculación simulada significa una inoculación falsa).

35 La figura 5 muestra la inhibición de la infección causada por el virus del mosaico del pepino inducida rociando sobre plantas de tomate un derivado de la fermentación del ácido glutámico (las fotografías muestran la morfología de la planta). Los valores numéricos que se muestran en la parte superior de las hojas inoculadas indican las concentraciones de los líquidos derivados de la fermentación de aminoácidos utilizados para el tratamiento.

40 La figura 6 muestra la inhibición de la infección causada por el virus del mosaico del pepino inducida rociando sobre plantas de pimiento un derivado de la fermentación del ácido glutámico (las fotografías muestran la morfología de la planta). Los valores numéricos que se muestran en la parte superior de las hojas inoculadas indican las concentraciones de los líquidos derivados de la fermentación de aminoácidos utilizados para el tratamiento.

45 La figura 7 muestra el efecto de rociar sobre las superficies foliares un líquido derivado de la fermentación de treonina para inhibir la infección del virus del mosaico del pepino (las fotografías muestran la morfología de la planta). Los valores numéricos (0 %, 0,5%, 1,0 %) que se muestran en la parte superior de las hojas superiores inoculadas indican concentraciones de los líquidos derivados de la fermentación de treonina utilizados para el tratamiento.

50 La figura 8 muestra el efecto de rociar sobre las superficies foliares un líquido derivado de la fermentación de ácido nucleico comparativo (mezcla de líquidos derivados de la fermentación de inosina, guanosina, adenosina, ácido inosínico y ácido guanílico) para inhibir la infección del virus del mosaico del pepino (las fotografías muestran la morfología de la planta). Los valores numéricos (0 %, 0,5 %, 10 %) que se muestran en la parte superior de las hojas superiores inoculadas indican concentraciones de los líquidos derivados de la fermentación de ácido nucleico utilizados para el tratamiento.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

60 El inhibidor de infecciones causadas por fitovirus utilizado en la presente invención (en adelante, también denominado "agente de la presente invención" o simplemente "agente") contiene un derivado de la fermentación de aminoácidos como se define en la reivindicación 1. "Inhibición de infecciones causadas por virus" significa controlar o mejorar al menos uno los virus de los géneros *Tobamovirus* y *Cucumovirus* y puede basarse en cualquiera de supresión de la invasión de virus en las células vegetales, supresión de la proliferación de virus, y de los que sean distintos de estos. Por lo tanto, el "inhibidor de infecciones causadas por virus" puede ser un "agente controlador de virosis". Además, el "método para inhibir infecciones causadas por un virus en las plantas" puede ser un "método

para controlar una fitovirosis".

El derivado de la fermentación de aminoácidos es un término genérico para referirse a un líquido derivado que queda después de eliminar, del caldo de fermentación, el aminoácido producido por la fermentación (líquido derivado de la fermentación de aminoácidos), un concentrado o sólido seco del mismo, un producto de fraccionamiento del mismo, y etcétera. En este derivado de fermentación de aminoácidos, queda el aminoácido y/o un derivado del mismo, producido por la fermentación.

El líquido derivado de la fermentación puede contener el ácido añadido para recoger la sustancia diana del medio, y puede someterse a un tratamiento térmico para la desinfección, etc.

El aminoácido contenido en el derivado de la fermentación de aminoácidos incluye ácido glutámico o treonina como se especifica en la reivindicación 1. Por otro lado, el aminoácido o ácido nucleico contenido en el derivado de la fermentación puede consistir en uno o dos o más tipos de aminoácidos o ácidos nucleicos.

Como ejemplos específicos del derivado de la fermentación de aminoácidos se incluyen, por ejemplo, un líquido madre obtenido ajustando con un ácido mineral el pH de un líquido de la fermentación de un aminoácido ácido, tal como ácido L-glutámico, al punto isoeléctrico, y separando los cristales depositados del aminoácido por separación de sólido/líquido, y un concentrado de los mismos.

Dichos derivados de fermentación normalmente contienen, como contenido sólido, varios aminoácidos (que en el caso de un concentrado de 5 a 20 veces contiene del 5 al 14 % en peso) o varios ácidos nucleicos (que en el caso de un concentrado de 5 a 20 veces contiene del 5 al 15 % en peso), así como muchos nutrientes tales como sacáridos, células bacterianas de fermentación, nitrógenos orgánicos, nitrógenos minerales y vitaminas (el contenido sólido es del 30 al 50 % en peso).

El derivado de la fermentación de un aminoácido en un estado de un líquido derivado de la fermentación obtenido después de la separación del aminoácido diana y antes de una operación, tal como concentración, desecación o fraccionamiento, contiene 1 mM o más, más preferentemente 2 mM o más, más preferentemente 5 mM o más, del aminoácido. Por otro lado, el derivado de la fermentación de un aminoácido puede contener aminoácidos distintos del aminoácido como sustancia diana de la fermentación. Por otro lado, el derivado de la fermentación de un aminoácido puede ser una mezcla de dos o más tipos de derivados de la fermentación obtenidos mediante la producción de fermentación de diferentes aminoácidos como sustancias diana.

El líquido derivado de la fermentación de aminoácidos del presente método se obtiene cultivando un microorganismo perteneciente a los géneros *Corynebacterium*, *Pantoea* o *Escherichia*, en un medio que contenga una fuente de azúcar tal como sacarosa, almidón, caña de azúcar, maíz, remolacha azucarera, mandioca, algas, como las del género *Euglena*, como materia prima principal, y una fuente de nitrógeno, así como nutrientes tales como iones inorgánicos y otros, disminuyendo el pH del medio después del cultivo con, por ejemplo, ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, separando el aminoácido precipitado, y sometiendo el medio a una concentración o tratamiento térmico. La solución madre de dicho líquido derivado de la fermentación normalmente contiene aproximadamente del 1 al 10 % (p/v) de aminoácidos.

Como ejemplos del microorganismo y del medio utilizados para la fermentación se incluyen, por ejemplo, los descritos en las publicaciones de patentes europeas EP 0643135 B, EP 0733712 B, EP 1477565 A, EP 0796912 A, EP 0837134 A, EP 1170376 A, en las publicaciones de patentes internacionales WO01/53459, WO2005/010175, WO96/17930, y etcétera.

El líquido derivado de la fermentación del ácido L-glutámico líquido, el líquido derivado de la fermentación de L-treonina y el líquido derivado de la fermentación de ácido nucleico comparativo (mezcla de líquidos derivados de la fermentación de inosina, guanosina, adenosina, ácido inosínico y ácido guanílico) usados en el apartado de Ejemplos descrito más adelante, se obtuvieron como se ha descrito anteriormente usando *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* o *Bacillus amyloliquefaciens*.

El aminoácido incluye aminoácidos libres y/o sales de los mismos, por ejemplo, sulfatos, clorhidratos, carbonatos, sales de amonio, sales de sodio y sales de potasio. Por otro lado, aunque el aminoácido puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido, preferentemente es un L-aminoácido.

Como se ha mencionado anteriormente, el inhibidor de infecciones causadas por fitovirus, utilizado en la presente invención, contiene dicho derivado de la fermentación de aminoácidos. Por otro lado, el inhibidor de infecciones causadas por fitovirus puede contener tanto el derivado de la fermentación de un aminoácido como el derivado de la fermentación de un ácido nucleico.

Dado que, como se muestra en el Ejemplo 2 descrito más adelante, el agente utilizado en la presente invención puede mejorar la resistencia a un virus también en un tejido vegetal al que el agente no se aplica directamente, el método para aplicarlo a una planta no está particularmente limitado. Sin embargo, dado que en las regiones a las

que se aplicó directamente el agente, se observó un efecto de inhibición de infección causada por virus extremadamente alto, el agente se roció sobre el cuerpo de una planta, por ejemplo, el cuerpo de toda la planta o en las superficies foliares.

5 El agente usado en la presente invención está en una forma que permite rociarlo, y puede estar, por ejemplo, en forma de cualquier agente líquido, tal como, una emulsión, un polvo humectable, un aceite, un aerosol, y un agente fluido, pero se prefiere que pueda rociarse uniformemente sobre las superficies de las plantas, ya que el agente muestra un efecto especialmente alto en las regiones rociadas. Por otro lado, el agente puede ser un agente en polvo o un agente sólido, siempre y cuando se pueda preparar en una forma que permita su rociado en el momento del uso. En cuanto a un agente líquido, el "rociado" incluye la "pulverización".

15 El contenido del derivado de la fermentación de aminoácidos, y del aminoácido, se especifica en la reivindicación 1, y puede determinarse adecuadamente dependiendo del tipo de planta, de la cantidad de aplicación del agente a las plantas, y etcétera. Específicamente, en cuanto al derivado de la fermentación de aminoácidos, cuando el agente es un líquido, o cuando el agente es un sólido pero se usa como líquido en el momento del uso, el contenido es, preferentemente, del 0,01 % en peso o mayor, más preferentemente del 0,1 % en peso o mayor, en términos del contenido del líquido derivado de la fermentación. Aunque el contenido máximo no está particularmente limitado, el contenido es preferentemente del 10 % en peso o menor, más preferentemente del 1 % en peso o menor, más preferentemente del 0,5 % en peso o menor. La expresión "en términos del contenido del líquido derivado de la fermentación" significa que cuando el derivado de la fermentación es un concentrado, un producto seco o similar de un líquido derivado de la fermentación, el contenido se representa como contenido en peso del líquido derivado de la fermentación original.

25 Como se ha descrito anteriormente, el agente usado en la presente invención tiene una acción de controlar significativamente la infección causada por virus en una región en donde el agente se aplica directamente por rociado o recubrimiento del agente, además de la acción de inducir resistencia a un virus.

30 Aunque el agente se aplica preferentemente 1 a 10 días antes del día en el que se espera la infección causada por virus, preferentemente se rocía a una frecuencia tan alta como sea posible en vista de dicho mantenimiento de resistencia inducida y control de la infección vírica en una región en donde el agente se aplica como se ha descrito anteriormente, y es recomendable rociarlo a una frecuencia de una vez cada 3 a 7 días, o al menos una vez cada dos semanas. En el caso de un agente líquido, la concentración apropiada del líquido que se va a rociar es generalmente del 0,1 al 1,0 % (v/v) en términos del líquido derivado de la fermentación, pero si se rocía a una concentración superior a la necesaria, puede aparecer fitotoxicidad dependiendo del tipo de planta y, por lo tanto, estrictamente hablando, la concentración que se va a rociar varía dependiendo del tipo de producto agrícola que se va a proteger. Por ejemplo, en el caso del tabaco, la concentración es, preferentemente, del 0,2 al 2,0 % (v/v), y en el caso del tomate es, preferentemente, del 0,05 al 1,0 % (v/v).

40 Por otro lado, aunque la cantidad de rociado puede variar dependiendo del tipo de producto agrícola, de la superficie total de hojas y de la tasa de dilución del agente, dicha cantidad varía, preferentemente, de 1 a 100 kg/hectárea en términos del contenido sólido del derivado de la fermentación.

45 Dado que normalmente en el líquido derivado de la fermentación queda un componente antiespumante, y que este muestra un efecto difusor, el agente puede usarse sin añadir ningún agente difusor, pero para aplicar más eficazmente el agente en las superficies de los productos agrícolas, es recomendable añadir además un agente difusor a una concentración final del 0,01 al 0,5 % en peso.

50 Como ejemplos de fitovirus cuya infección puede inhibirse según la presente invención, se incluyen virus del género *Tobamovirus* tales como el virus del mosaico del tabaco, virus del mosaico del tomate y virus del moteado leve del pimiento, y virus del género *Cucumovirus* tal como el virus del mosaico del pepino.

55 Para inhibir de manera eficaz una virosis, el rociado del agente por todo el cuerpo de la planta se puede combinar con el bloqueo de la vía de infección usando un pesticida, eliminando una planta que tenga una enfermedad en una etapa temprana de la enfermedad, vacunando con virus atenuados, y etcétera.

Ejemplos

60 En lo sucesivo, la presente invención se explicará más específicamente con referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

Ejemplo 1: Efecto inhibidor de infecciones causadas por fitovirus del líquido derivado de la fermentación de aminoácidos

65 A los cuerpos completos de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv *Samsun*) que se hicieron crecer después de la siembra durante aproximadamente cinco semanas, se rociaron líquidos derivados de la fermentación del ácido L-glutámico diluidos a concentraciones de 0 % (agua esterilizada), 0,1 % (v/v), 0,5 % (v/v) y 1,0 % (v/v), y las plantas

se cultivaron durante dos días. En toda la superficie de una hoja inferior de un tamaño apropiado, se roció ligeramente carborundo (Nakalai Tesque), y la cepa Y del virus del mosaico del pepino (VMP) o el virus del mosaico del tabaco (VMT) se inoculó artificialmente por goteo con 100 µl por hoja de una solución de 5 µg/ml de VMP o de una solución de 2,5 µg/ml de VMT, y extendiendo la solución barriendo toda la superficie de la hoja con los dedos usando un guante de goma. La hoja inoculada se recogió 5 días después de la inoculación, y 9 días después de la inoculación, se recogió una hoja superior. La savia foliar preparada de cada hoja se transfirió a papel de filtro, y la localización del VMP o del VMT se detectó mediante inmunotinción (TPI) usando un antisuero anti-VMP o un antisuero anti-VMT.

Como resultado, se observó una tendencia a que el número de sitios de infección disminuyera de una manera dependiente de la concentración del líquido derivado de la fermentación utilizado para el tratamiento de las hojas inoculadas (Fig. 1). Por otro lado, en los grupos tratados con líquido derivado de la fermentación, se observó una inhibición de la transferencia del VMP a las hojas superiores del 0,5 al 1,0 %. En este experimento, aunque en las hojas superiores pueda haberse observado VMP, la señal de la tinción tendió a disminuir, de una manera dependiente de la concentración, en un líquido derivado de la fermentación. Por otro lado, en los grupos tratados, también se observó una prolongación del tiempo hasta que aparecieron los síntomas (Fig. 2). En el experimento en el que las plantas se infectaron con el VMT (Fig. 3), se confirmaron estos mismos fenómenos. Basándose en estos resultados experimentales, se estimó que el líquido derivado de la fermentación mostraba un efecto de inhibición de infección causada por virus rociando las superficies foliares, y la cantidad de invasión del virus se reducía como resultado de proporcionar un retraso en el desarrollo de la infección sistémica.

Ejemplo 2: Inhibición eficaz de infección causada por virus proporcionada por la aplicación directa de líquido derivado de fermentación de aminoácidos

Como una de las respuestas contra las virosis, se puede mencionar la activación de la ruta del ácido salicílico. Por ejemplo, es de sobra conocido que la sensibilidad a los virus aumenta en el cuerpo de una planta en la que se sobreexpresa una enzima que descompone el ácido salicílico, y se considera que la activación de la ruta del ácido salicílico es uno de los mecanismos de resistencia de las plantas contra los virus. Por otro lado, el ácido salicílico es un factor de señal de las plantas, y es una hormona vegetal que induce la inducción de resistencia sistémica (resistencia adquirida sistémica). Para verificar si la inhibición de la infección causada por virus observada con un líquido derivado de la fermentación se inducía o no mediante la activación de esta ruta, se realizó el siguiente experimento.

Se aplicó un líquido derivado de la fermentación de ácido glutámico al 1,0 % (v/v) o agua esterilizada a una mitad de la superficie de una hoja (diagrama esquemático mostrado en la figura 4) de una planta de tabaco cultivada en las mismas condiciones que las del Ejemplo 1, y la planta se cultivó además durante dos días. A continuación, se inoculó VMP o VMT en toda la hoja de la misma manera que la del Ejemplo 1, y la hoja inoculada se recogió después de cultivarla durante tres días. Cada savia foliar se transfirió a papel de filtro, y la localización de cada virus se detectó mediante TPI usando un antisuero anti-VMP o un antisuero anti-VMT.

Si la biosíntesis de ácido salicílico o la resistencia sistémica adquirida provoca la inhibición de la infección causada por virus, en la mitad de la superficie de la hoja donde no se aplicó directamente el líquido derivado de la fermentación, también debe observarse un fenómeno en el que aparecen manchas de infección marcadas.

Como resultado, en las hojas donde se aplicó el líquido derivado de la fermentación, el número de manchas de infección disminuyó en la mitad de la superficie de la hoja donde no se aplicó directamente el líquido derivado de la fermentación en comparación con la hoja tratada con agua esterilizada (Fig. 4). Como ya se había revelado que el resto de las células bacterianas de fermentación contenidas en un líquido derivado de fermentación tenía una actividad desencadenante que inducía resistencia (WO2009/88074), se consideró que la resistencia se inducía también en la mitad derecha donde no se aplicó el líquido derivado de fermentación, y como resultado se observó un efecto de la inhibición de la infección causada por virus hasta cierto nivel.

Por otro lado, se observó inesperadamente que el número de manchas de infección disminuía más marcadamente, específicamente en una parte que estaba directamente en contacto con el líquido derivado de la fermentación (Fig. 4). Basándose en este resultado,

se consideró que la inhibición de la infección causada por virus observada con el líquido derivado de la fermentación se producía por una cierta reacción o respuesta que de forma característica tenía lugar en una región en donde el líquido derivado de la fermentación se aplicaba directamente, además de la inducción de la resistencia a las enfermedades de la planta inducida por la actividad desencadenante contenida en el líquido derivado de la fermentación.

Ejemplo 3: Efecto inhibitorio de infecciones causadas por virus en tomate

Dos días después de rociar con un líquido derivado de la fermentación del ácido glutámico, las superficies foliares de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, variedad: Momotaro Fight), se inocularon con 5 µg/ml de VMP de la

misma manera que la del Ejemplo 1. Después de cuatro días, la localización del VMP se detectó mediante TPI utilizando un antisuero anti-VMP. Como resultado, se observó una disminución, dependiente de la concentración del líquido derivado de la fermentación, del número de manchas de infección causada por virus (Fig. 5).

5 **Ejemplo 4: Efecto inhibitor de infecciones causadas por virus en pimiento**

10 Dos días después de rociar con un líquido derivado de la fermentación del ácido glutámico, las superficies foliares de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*, variedad: Shosuke), se inocularon con 5 µg/ml de VMP de la misma manera que la del Ejemplo 1. Después de cuatro días, la localización del VMP se detectó mediante TPI utilizando un antisuero anti-VMP. Como resultado, al igual que ocurrió en las plantas de tabaco y de tomate, en las plantas de pimiento, se observó una disminución, dependiente de la concentración del líquido derivado de la fermentación, del número de manchas de infección causada por virus (Fig. 6).

15 **Ejemplo 5: Inhibición de infecciones causadas por virus con un líquido derivado de la fermentación de aminoácidos distintos del ácido glutámico**

20 En todos los experimentos descritos anteriormente, se utilizaron líquidos derivados de la fermentación del ácido glutámico. Por lo tanto, para verificar si un líquido derivado de la fermentación de un aminoácido distinto del ácido glutámico también tenía la misma acción, de la misma manera que la del Ejemplo 1, se aplicó un líquido derivado de la fermentación de L-treonina a plantas de tabaco, se inoculó VMP, y después de 3 días, se detectó la localización del virus. Como resultado, como en el caso del uso del líquido derivado de la fermentación del ácido glutámico, se observó una disminución dependiente de la concentración del número de manchas de infección (Fig. 7). Este resultado sugiere que un líquido derivado de la fermentación de aminoácidos distinto del ácido glutámico también tenía un efecto inhibitor de infecciones causadas por virus.

25 **Ejemplo comparativo: Inhibición de infecciones causadas por virus con líquido derivado de la fermentación de ácido nucleico**

30 Para verificar si un líquido derivado de la fermentación de ácido nucleico también tiene el efecto, un líquido derivado de la fermentación de ácido nucleico (mezcla de líquidos derivados de la fermentación de inosina, guanosina, adenosina, ácido inosínico y ácido guanílico) se roció sobre las superficies foliares de plantas de tabaco. A continuación, de la misma manera que la del Ejemplo 1, se inocularon 5 µg/ml de VMP, y después de cuatro días, la localización del VMP se detectó mediante TPI utilizando un antisuero anti-VMP. Como resultado, como en el caso del uso del líquido derivado de la fermentación de aminoácidos (Fig. 8), se observó una disminución, dependiente de la concentración del líquido derivado de la fermentación, de la cantidad de manchas de infección causada por virus. Este resultado sugiere que un líquido derivado de la fermentación de ácido nucleico también tiene un efecto de inhibición de infecciones causadas por virus.

40 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención permite proporcionar una inhibición eficaz de infecciones causadas por fitovirus, y por tanto, reducir las fitovirosis en diversas plantas.

45 Dado que los líquidos derivados que quedan después de la fermentación de aminoácidos o de la fermentación de ácidos nucleicos pueden usarse para la inhibición de infecciones causadas por fitovirus de la presente invención, estos pueden obtenerse fácilmente a un bajo coste y también pueden producirse a gran escala.

REIVINDICACIONES

1. Un método de inhibición de infección de una planta seleccionada de tabaco, tomate, pimiento y guindilla, por un virus seleccionado de un virus de los géneros *Tobamovirus* y *Cucumovirus*, comprendiendo el método:
- 5
- (i) cultivar un microorganismo perteneciente a los géneros *Corynebacterium*, *Pantoea* o *Escherichia* en un medio que contenga una fuente de azúcar, una fuente de nitrógeno y nutrientes;
 - (ii) disminuir el pH del medio después de finalizar el cultivo usando un ácido mineral y eliminar el aminoácido precipitado para producir un medio que tenga una concentración de al menos 1 mM de un aminoácido

10

 - seleccionado de treonina o ácido glutámico;
 - (iii) someter el medio a una concentración o a un tratamiento térmico para producir un líquido derivado de la fermentación;
 - (iv) producir un inhibidor de infecciones causadas por virus que contenga el derivado de la fermentación de aminoácidos a una concentración del 0,01 al 10 % (v/v) en términos de concentración de líquido derivado de la

15

 - fermentación de aminoácidos; y
 - (v) rociar sobre la planta el inhibidor de infecciones causadas por virus.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la concentración del aminoácido en el medio después de eliminar el aminoácido precipitado es de 5 mM o mayor.
- 20
3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el virus del género *Tobamovirus* es el virus del moteado leve del pimiento, el virus del mosaico del tabaco o el virus del mosaico del tomate, y el virus del género *Cucumovirus* es el virus del mosaico del pepino.
- 25
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se rocía el inhibidor de infecciones causadas por virus 1 a 10 días antes de un día en el que se espera que se produzca la infección causada por virus.

Fig. 1

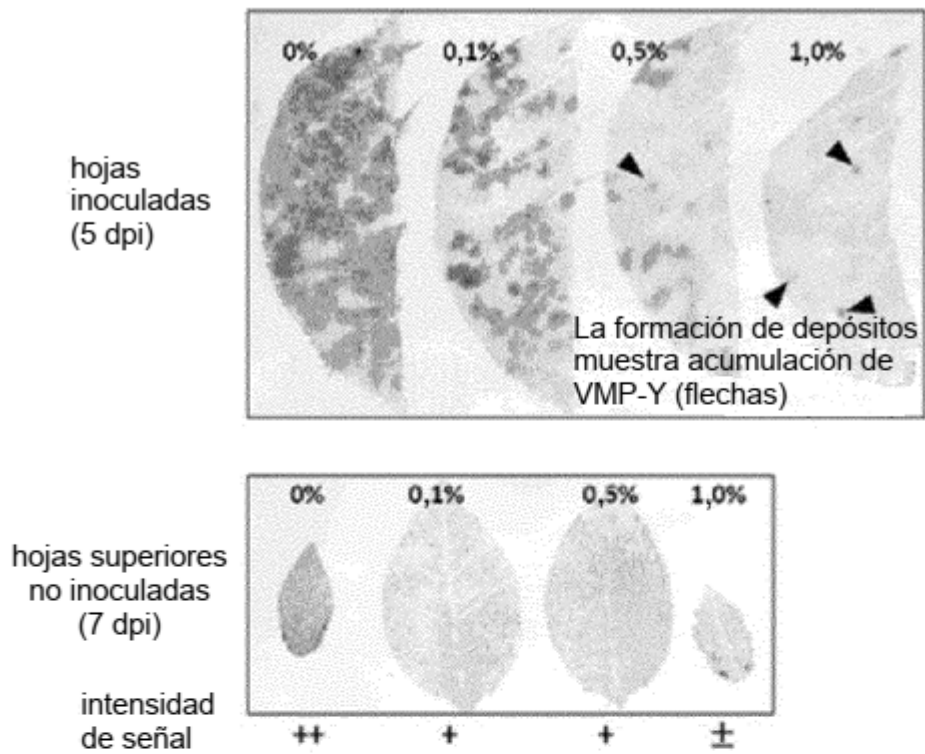


Fig. 2

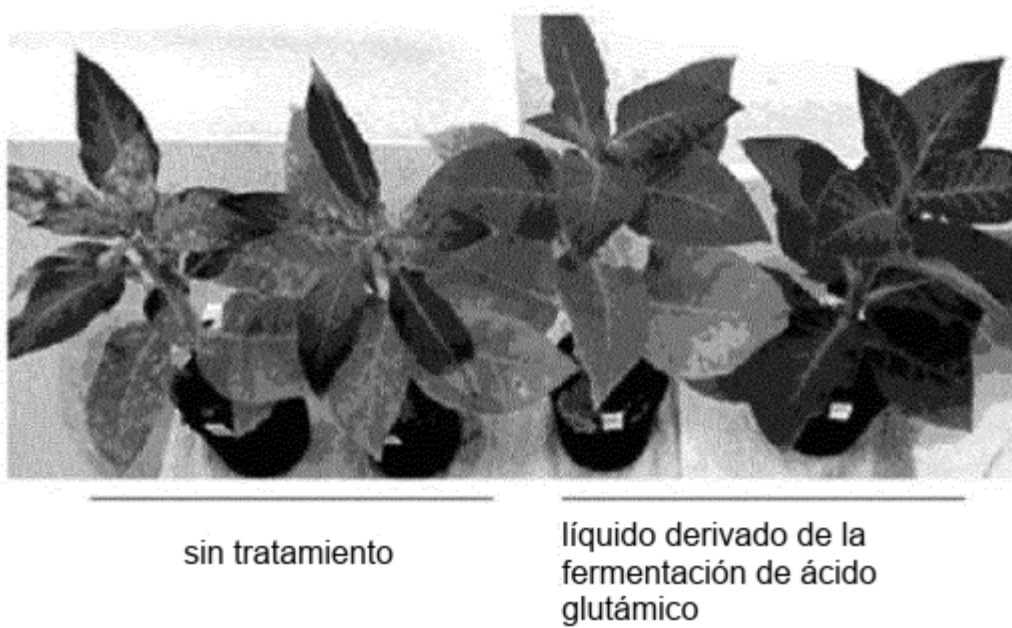


Fig. 3

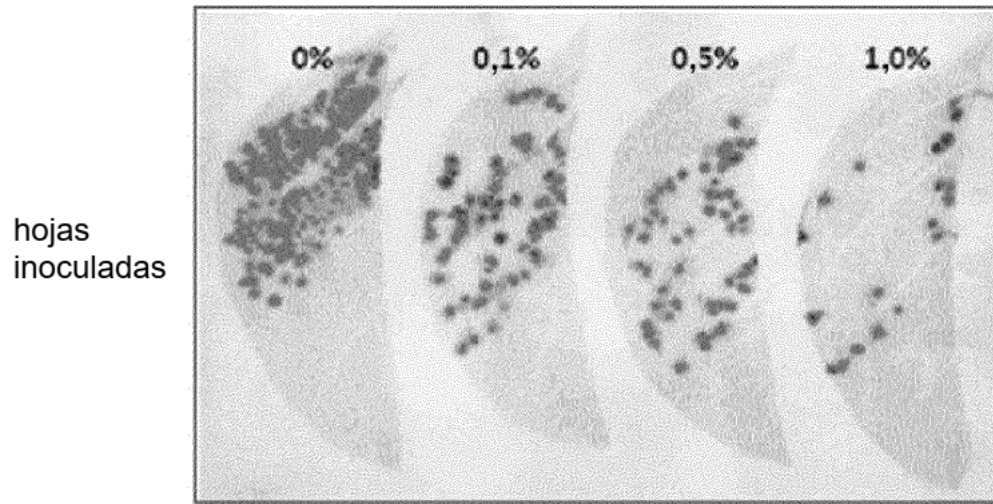
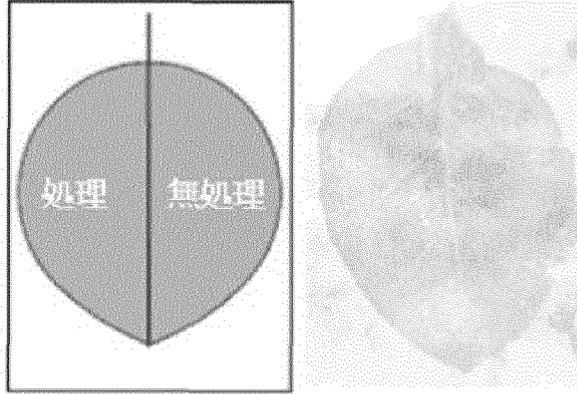
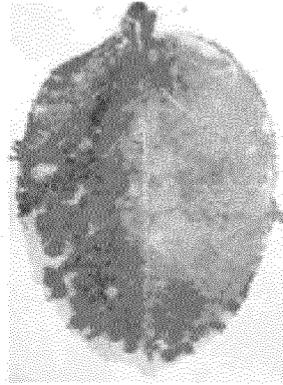


Fig. 4

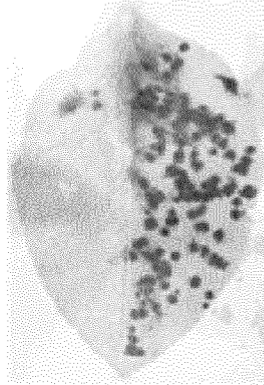
diagrama esquemático Inoculación simulada



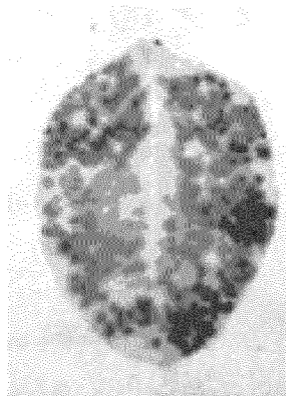
Inoculación de agua esterilizada + VMP-Y



Inoculación de líquido derivado + VMP-Y



Inoculación de agua esterilizada + VTM



Inoculación de derivado + VMT

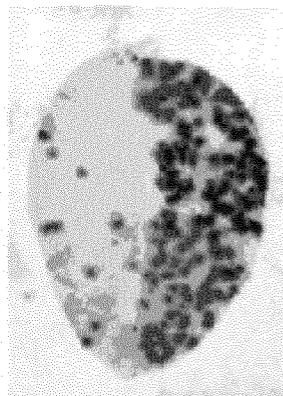


Fig. 5

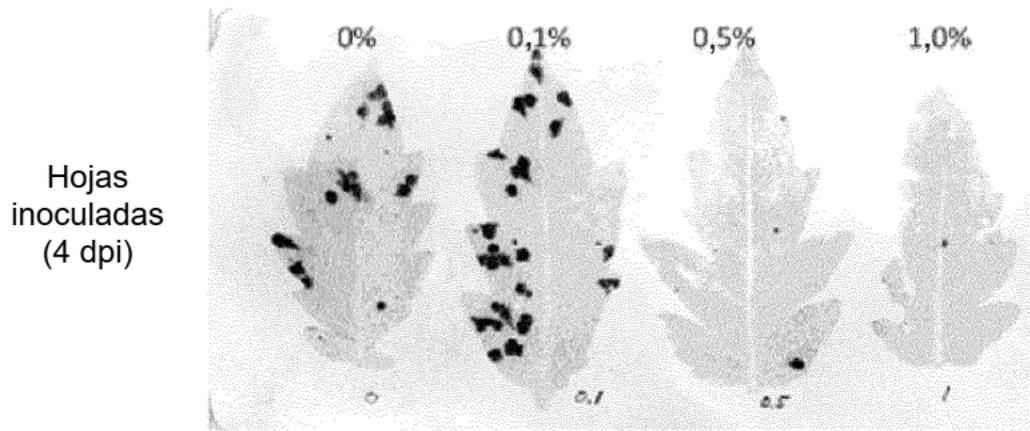


Fig. 6

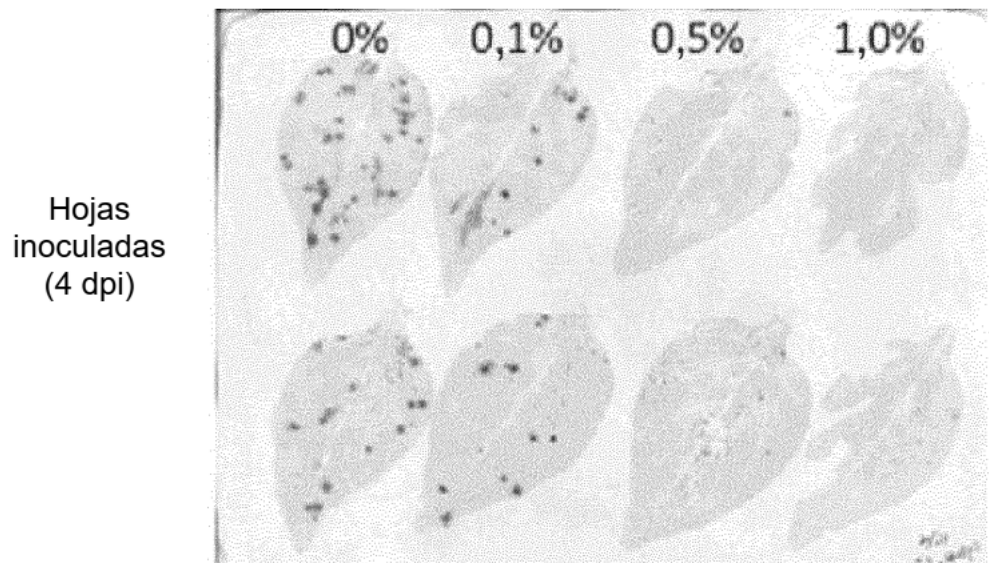


Fig. 7

Hojas
inoculadas
(3 dpi)

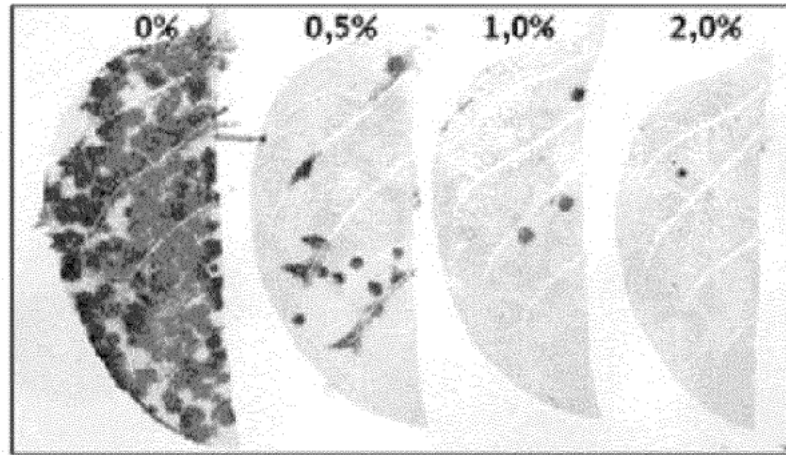


Fig. 8

Hojas
inoculadas
(3 dpi)

