

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 400**

51 Int. Cl.:

A01N 37/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2013 PCT/EP2013/064547**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009402**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2013 E 13735265 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2871956**

54 Título: **Uso del ácido 4-fenilbutírico para mejorar la tolerancia de las plantas a organismos bioagresores**

30 Prioridad:

11.07.2012 FR 1256660

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

04.11.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DÉVELOPPEMENT (IRD) (100.0%)
Immeuble le Sextant 44 Bd Dunkerque CS90009
13002 Marseille 2, FR**

72 Inventor/es:

**CACAS, JEAN-LUC y
CHAMPION, ANTONY**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 791 400 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

Uso del ácido 4-fenilbutírico para mejorar la tolerancia de las plantas a organismos bioagresores

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere al uso del ácido 4-fenilbutírico para mejorar la resistencia de las plantas a organismos bioagresores, en particular a las bacterias.

10 Estado de la técnica

La lucha contra las enfermedades de las plantas es una preocupación importante de la agricultura. Se estima que en todo el mundo aproximadamente un tercio de las cosechas son destruidas en el campo o durante su almacenamiento, por agentes patógenos (insectos, virus, bacterias, oomicetos u hongos). Esto se traduce en pérdidas económicas considerables y, en ciertas regiones del mundo, puede conducir a problemas de desnutrición o malnutrición de las poblaciones.

Con el tiempo, se han desarrollado varios enfoques para luchar contra las enfermedades de las plantas, siendo el más antiguo el enfoque químico que hace uso de plaguicidas, tales como fungicidas, bactericidas, nematocidas, viricidas e insecticidas. Aunque es eficaz, el uso de moléculas procedentes de la industria química en general se asocia con problemas de contaminación y riesgos potenciales para la salud humana y animal. Además, muchos fitopatógenos de origen vírico o bacteriano no son sensibles a los productos químicos disponibles actualmente en el mercado, y ciertos hongos patógenos, ácaros, nematodos e insectos patógenos pueden soportar grandes dosis de plaguicidas sin daños.

Desde entonces, se han desarrollado alternativas a los tratamientos químicos y se usan habitualmente en el campo o están llegando poco a poco al mercado. Debe mencionarse, en particular, el control biológico que emplea organismos predadores naturales contra los agentes patógenos de las plantas; mejora genética de las plantas, que sigue siendo uno de los métodos de elección cuando se identifican genes estables de resistencia o tolerancia que se pueden introducir en el material hereditario de las plantas; y métodos basados en la resistencia natural de las plantas a las enfermedades causadas por las plagas.

La resistencia natural de las plantas a las enfermedades causadas por plagas a menudo se inicia por el reconocimiento específico de un patógeno dado, y en particular por el reconocimiento de moléculas llamadas "inductores" o "efectores" presentes en la superficie de los patógenos o excretados por estos. Este reconocimiento conduce a una inducción rápida de los mecanismos de defensa de la planta que limitan la multiplicación y propagación del patógeno en los diferentes tejidos vegetales. Hay trabajos que han demostrado que la aplicación de inductores en una planta aumenta la resistencia de estas a los organismos bioagresores activando preventivamente sus reacciones de defensa. Esta estimulación de las defensas naturales ha abierto el camino a nuevos enfoques en la lucha contra las enfermedades de las plantas y está generando cada vez más interés. Sin embargo, los inductores presentan la desventaja de tener un espectro de acción limitado y un coste todavía demasiado elevado.

La mayoría de los métodos ya existentes basados en la explotación de los mecanismos de defensa natural de las plantas dependen de la activación de la muerte celular hipersensible en contextos donde la planta no lo hace normalmente. Aunque estos métodos indudablemente conducen a la resistencia, tienen como consecuencia que provocan la muerte de los tejidos infectados. Incluso aunque esta muerte sea en beneficio del resto de la planta, da como resultado una pérdida de rendimiento.

A pesar de los progresos realizados, existe todavía la necesidad de nuevas estrategias de lucha contra las enfermedades de las plantas causadas por agentes patógenos.

Objeto de la invención

En general, la presente invención se basa en el uso del ácido 4-fenilbutírico (4-PBA) en el campo de la agricultura. De hecho, los autores de la invención han mostrado que el 4-PBA inhibe la muerte celular hipersensible inducida por agentes fitopatógenos y que la aplicación de 4-PBA a las plantas permite mejorar su resistencia a estos agentes sin afectar al rendimiento de las plantas. Los autores de la invención también han demostrado que, además de sus efectos en las plantas, el 4-PBA presenta propiedades antimicrobianas contra los agentes fitopatógenos. En comparación con los principios activos químicos actualmente disponibles en el mercado, el 4-PBA tiene la ventaja de no ser tóxico ni para el ser humano ni para el medio ambiente en las dosis usadas, incluyendo para las plantas a las que se administra. Además, es relativamente barato.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método de destrucción de un fitopatógeno y/o de inhibición del crecimiento de un fitopatógeno para prevenir o tratar una enfermedad de plantas causada por dicho fitopatógeno, que comprende aplicar, a la planta o al suelo que rodea la planta, una cantidad suficiente de 4-PBA, o una de sus sales, caracterizado por que el fitopatógeno se elige entre las bacterias.

En algunas realizaciones, el fitopatógeno es preferiblemente biótrofo.

5 En ciertas realizaciones, el método según la invención se caracteriza por que el 4-PBA, o una de sus sales, se aplica antes de la emergencia de la planta.

Alternativa o adicionalmente, el 4-PBA, o una de sus sales, se puede aplicar después de la emergencia de la planta.

10 En ciertas realizaciones, el 4-PBA, o una de sus sales, se aplica a las partes aéreas de la planta, a las raíces de la planta, a las semillas, tubérculos o bulbos de la planta, y/o a los frutos o granos de la planta.

15 En ciertas realizaciones, el método según la invención se caracteriza por que la planta pertenece a la familia de Malváceas, a la familia de Solanáceas, a la familia de Rubiáceas, a la familia de Poáceas o Gramíneas o a la familia de Vitáceas.

A continuación se proporciona una descripción más detallada de algunas realizaciones preferidas de la invención.

Descripción detallada de la invención

20 Como se ha mencionado antes, se describe en la presente memoria el uso del ácido 4-fenilbutírico (4-PBA) para mejorar la resistencia de las plantas a organismos bioagresores sin afectar a su rendimiento. En particular, el 4-PBA se puede usar para mejorar la resistencia de las plantas a las bacterias; para inhibir la muerte celular hipersensible inducida por estos fitopatógenos; y/o para destruir estos fitopatógenos y/o limitar su crecimiento y reproducción.

25 I - Ácido 4-fenilbutírico y sus sales

El ácido 4-fenilbutírico (también llamado ácido 4-fenilbutanoico) es una molécula pequeña que, debido a sus propiedades biológicas, ha encontrado aplicación en el campo de la farmacia y cuyo uso en el campo de la agricultura se ha propuesto recientemente.

30 El 4-PBA es una molécula chaperona, es decir, una molécula que ayuda a las proteínas en su maduración al asegurarles un plegamiento tridimensional adecuado (Cohen et al., *Nature*, 2003, 426: 905-909). Varios estudios han mostrado que, en mamíferos, el 4-PBA inhibe el estrés del retículo endoplásmico y elimina el desencadenamiento de la UPR (Upfolded Protein Reponse (Respuesta a proteínas mal plegadas)). El 4-PBA está aprobado para el tratamiento de enfermedades del ciclo de la urea (Maestri et al., *N. Engl. J. Med.*, 1996, 335: 855-859), y se ha propuesto como agente terapéutico en el tratamiento de patologías como la diabetes tipo 2 y enfermedades neurodegenerativas.

40 En las plantas, se ha descrito que la aplicación de 4-PBA a los cultivos permite controlar la producción de auxina (una fitohormona de crecimiento de las plantas) y así aumentar sus rendimientos (Patente US 6.245.717). También se ha descrito que la aplicación de 4-PBA a las plantas da como resultado una mejora en la resistencia de las plantas al estrés abiótico, como la sequía, el calor o la aridez (Solicitud US 2012/0077677). Finalmente, se ha demostrado que se puede prevenir la fusariosis de la espiga, una enfermedad que afecta a los cultivos y es causada por un hongo necrotrofo del género *Fusarium*, mediante la aplicación de moléculas chaperonas, como el 4-PBA, a los cultivos (Solicitud US 2010/0261694).

50 En el contexto de la invención, el 4-PBA se puede usar en forma de ácido 4-fenilbutírico o en forma de una de sus sales. Por "sal del 4-PBA" se entiende cualquier compuesto obtenido haciendo reaccionar el 4-PBA, que actúa como un ácido, con una base adecuada para formar, por ejemplo, una sal de metal alcalino, tal como sodio, potasio y litio; una sal de metal alcalinotérreo, tal como calcio y magnesio; una sal de un metal de transición, tal como manganeso, cobre, cinc y hierro; una sal de amonio; una sal de fosfonio; una sal de sulfonio; una sal de oxonio; una sal de colina; o una sal con una base orgánica que contiene un átomo de nitrógeno, tal como la trimetilamina, trietilamina, tributilamina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, dietilamina, dicitlohexilamina, dibencilamina, piridina, guanidina, hidrazina y quinina. Preferiblemente, una sal del 4-PBA usada en la implementación de la presente invención es una sal de sodio, potasio, calcio, magnesio, manganeso, cobre, cinc, hierro, amonio, fosfonio, sulfonio u oxonio.

60 El 4-PBA se puede sintetizar por cualquier método, por ejemplo, por reacción de benceno con butirolactona en presencia de cloruro de aluminio seguido de una neutralización en presencia de base como se describe en la patente US 6.372.938.

65 En general, el 4-PBA, o una de sus sales, se aplica a las plantas en forma de disolución acuosa. Se puede usar solo o en combinación con otras sustancias tales como, por ejemplo, insecticidas, acaricidas, fungicidas, nematocidas, bactericidas, herbicidas, fitoprotectores, reguladores del crecimiento, complementos de elementos nutricionales y/o fertilizantes.

II. Uso del ácido 4-fenilbutírico para mejorar la resistencia de las plantas a los fitopatógenos

Los autores de la presente invención han mostrado que el 4-PBA mejora la resistencia de las plantas a los agentes fitopatógenos. A diferencia de la resistencia natural de las plantas que se basa en la activación de la muerte celular hipersensible y conduce a la muerte de los tejidos infectados, la resistencia que resulta de la aplicación del 4-PBA tiene lugar sin afectar el rendimiento de las plantas. De hecho, los autores de la invención han mostrado que el 4-PBA inhibe la muerte celular hipersensible inducida por los fitopatógenos, y por lo tanto previene la muerte de los tejidos infectados.

Por "resistencia a los fitopatógenos" se entiende que en el presente documento indica una serie de ventajas para las plantas. Dichas ventajas se pueden poner de manifiesto, por ejemplo, por una disminución en la predisposición de una planta a desarrollar una enfermedad causada por un fitopatógeno; una mejora en la capacidad de la planta para luchar contra una enfermedad causada por un fitopatógeno; una disminución de la presencia, en la planta, del número y/o la gravedad de los síntomas de una enfermedad por un fitopatógeno; una mejora en la estabilidad de almacenamiento de la planta una vez cosechada (y/o de sus frutos una vez recogidos); una mejora del aspecto de la planta debido a la ausencia o la presencia de un número limitado de sitios de necrosis, quemadura, mancha, podredumbre, agallas, tumor o marchitamiento en los tejidos de la planta; una mejora de la biomasa; una mejora del crecimiento de las raíces; una mejora de la producción de estolones; un aumento de la superficie foliar; una mejora de la reproducción sexual y/o vegetativa; un aumento en el número de flores; un aumento del volumen de los frutos; una mejora del aspecto de los frutos; un aumento en la concentración de nutrientes y constituyentes tales como, por ejemplo, glúcidos o carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas, minerales y fibras; una disminución en la cantidad de productos tóxicos o desfavorables contenidos en la planta, etc.

En lo que antecede, una mejora, un aumento o una disminución de una propiedad en general es al menos 3%, preferiblemente al menos 5%, y más preferiblemente aún al menos 10% con respecto a una planta que no se ha tratado con 4-PBA, o una de sus sales.

Por lo tanto, se describe en el presente documento el uso de 4-PBA, o una de sus sales, para mejorar la resistencia de las plantas a los agentes fitopatógenos.

Se describe también en el presente documento el uso de 4-PBA, o una de sus sales, para la prevención de una enfermedad de la planta causada por un agente fitopatógeno.

También se describe en el presente documento el uso de 4-PBA, o una de sus sales, para inhibir la muerte celular hipersensible inducida, en una planta, por un agente fitopatógeno. Como se usa en el presente documento, la expresión "muerte celular hipersensible" se refiere a la muerte de células vegetales infectadas con un patógeno, que es resultado de la respuesta hipersensible (HR), una reacción de defensa de la planta que tiene lugar en respuesta a una invasión por un patógeno.

Agentes patógenos

Por "agentes fitopatógenos" o "fitopatógenos" se entiende que se indica en el presente documento microorganismos capaces de infectar las plantas y desencadenar enfermedades en ellas. El agente fitopatógeno es una bacteria.

Preferiblemente, los agentes fitopatógenos son biotrofos, es decir, son microorganismos que se alimentan a expensas de la planta.

El 4-PBA se puede usar para mejorar la resistencia de las plantas a las bacterias fitopatógenas. Dichas bacterias fitopatógenas pueden pertenecer al grupo de α -proteobacterias, que contiene bacterias del género *Bacterium* (que en contacto con una herida, pueden causar en casi todos las dicotiledóneas, agallas o, a veces, la proliferación de raíces) y bacterias del género *Rhizobium* (que viven en simbiosis con las raíces de las leguminosas); o al grupo de β -proteobacterias, que contiene bacterias del género *Burkholderia* (que causan marchitamiento, podredumbre o necrosis) y bacterias del género *Ralstonia solanaceum* (que son responsables de enfermedades vasculares en regiones tropicales); o también al grupo de γ -proteobacterias, que contiene bacterias del género *Erwinia* (que son responsables de enfermedades importantes de las plantas).

El 4-PBA se puede usar en particular para mejorar la resistencia de las plantas a las bacterias del género *Xanthomonas*, en particular las especies *X. campestris*, *X. albilineans*, *X. alfalfae*, *X. ampelina*, *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. boreopolis*, *X. badnii*, *X. bromi*, *X. cassa-vae*, *X. citri*, *X. codiae*, *X. cucurbitae*, *X. cyanopsidis*, *X. cynarae*, *X. euvesicatoria*, *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. hyacinthi*, *X. malvacearum*, *X. manihotis*, *X. melonis*, *X. oryzae*, *X. papavericola*, *X. perforans*, *X. phaseoli*, *X. pisi*, *X. populi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens*, *X. vasicola* y *X. vesicatoria*.

Las bacterias de la especie *Xanthomonas campestris* pertenecen en particular a los patovares *armoraciae*, *begoniae*, *A. begoniae*, *B. campestris*, *carotae*, *corylina*, *dieffenbachiae*, *hederae*, *hyacinthi*, *juglandis*, *malvacearum*, *musacearum*, *nigromaculans*, *pelargonii*, *phaseoli*, *poinsettiicola*, *raphani*, *sesami*, *tardicrescens*, *translucens* y

vesicatoria, que atacan a numerosas especies vegetales de interés agronómico como el arroz, repollo, judías, los frutos de tipo cítricos como el limón, la caña de azúcar, etc.

5 El 4-PBA también se puede usar para mejorar la resistencia de las plantas a las bacterias del género *Pseudomonas*, en particular las especies *P. syringae*, *P. amygdali*, *P. avellanae*, *P. agarici*, *P. alcaligenes*, *P. asplenii*, *P. aurantiaca*, *P. aureofaciens*, *P. balearica*, *P. brassicacearum*, *P. cannabina*, *P. caricapapayae*, *P. cichorii*, *P. coronafaciens*, *P. cedrina*, *P. chlororaphis*, *P. corrugata*, *P. cissicola*, *P. citronellolis*, *P. congelans*, *P. constantinii*, *P. gengiri*, *P. extremorientalis*, *P. ficuserectae*, *P. flaves-cens*, *P. flectens*, *P. fluorescens*, *P. fuscovaginae*, *P. gessardii*, *P. grimontii*, *P. jessenii*, *P. kilonensis*, *P. lanceolata*, *P. libanensis*, *P. helianthi*, *P. lini*, *P. lundensis*, *P. meliae*, *P. reactans*, *P. resinovorans*, *P. rhodesiae*, *P. savastanoi*, *P. saccharophila*, *P. mediterranea*, *P. marginalis*, *P. mandelii*, *P. salomonii*, *P. putida*, *P. tolaasii*, *P. trivialis*, *P. tremae*, *P. veronii* y *P. viridiflava*.

15 Las bacterias de la especie *Pseudomonas syringae* pueden pertenecer en particular a los patovares *aceris*, *aptata*, *apii*, *antirrhini*, *avii*, *atrofaciens*, *atropurpurea*, *dysoxylis*, *japonica*, *lapsa*, *panici*, *papulans*, *pisi*, *syringae*, *aesculi*, *actinidiae*, *nigromaculans*, *pelargonii*, *glycenea*, *maculicola*, *passiflorae*, *persicae*, *phaseoli*, *poinsetticola*, *raphani*, *sesami*, *spinaceae*, *tabaci*, *tardicrescens*, *theae*, *tomato*, *translucens* y *vesicatoria*, que atacan muchas plantas de interés agronómico, incluyendo tomate, soja, tabaco, judía, limonero, peral, guisantes, cerezo, etc. El 4-PBA, o una de sus sales, se puede usar en particular para mejorar la resistencia de una planta a la bacteria *Pseudomonas solanacearum*, también llamada *Ralstonia solanacearum* o *Burkholderia solanacearum*, que está presente en todos los continentes, en particular en regiones tropicales y subtropicales. Esta bacteria es en particular el agente de la podredumbre parda de la patata, la enfermedad de Granville del tabaco y la enfermedad de Moko del platanero.

25 El 4-PBA también se puede usar para mejorar la resistencia de las plantas a las bacterias del género *Erwinia*, en especial, las especies *E. amylovora* que producen el fuego bacteriano en el peral y manzano, *E. carotovora* que es patógeno de numerosas frutas y hortalizas (zanahoria, remolacha, nabo, patata...), *E. aphidicola*, *E. billingiae*, *E. chrysanthemi*, *E. mallotivora*, *E. papayae*, *E. persicina*, *E. psidii*, *E. pyrifoliae*, *E. rhapontici*, *E. tasmaniensis*, *E. toletana*, y *E. racheiphila*. El 4-PBA, o una de sus sales, se puede usar en particular para mejorar la resistencia de una planta a la bacteria *E. chrysanthemi* también llamada *Dickeya dadantii*, que produce la enfermedad de la podredumbre húmeda. El 4-PBA, o una de sus sales, también se puede usar en el caso de la bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, también llamada *Pectobacterium atrosepticum*, que produce los síntomas de la podredumbre húmeda y de la pierna negra en la patata.

35 El 4-PBA también se puede usar para mejorar la resistencia de las plantas a las bacterias del género *Agrobacterium*, en especial la especie *A. tumefaciens* que es responsable de una enfermedad llamada agallas de la corona y que se traduce por la formación de un tumor en el sitio de infección, y la especie *A. vitis* que es responsable de la raíz pilosa, enfermedad caracterizada por la aparición de pelo radicular en el punto de infección.

40 El 4-PBA se puede usar también para mejorar la resistencia de las plantas a los virus patógenos de la familia Bigeminivirus, Monogeminivirus, Hybrigeminivirus, Ipomovirus, Macluravirus, Nanavirus, Ourmiavirus, ARN satélite, Satellivirus y Varicosavirus. Los ejemplos de dichos fitovirus incluyen los virus fitopatógenos de los géneros *Alfavirus*, *Begomovirus*, *Benyvirus*, *Caulimovirus*, *Carlavirus*, *Comovirus*, *Crinivirus*, *Cucumovirus*, *Curtovirus*, *Ilarvirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Nepovirus*, *Polerovirus*, *Pomovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Sobemovirus*, *Tymovirus*, *Trichovirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus* y *Tospovirus*.

45 Otros virus patógenos incluyen el virus A de la patata, el virus latente de la patata andina, virus del enrollamiento apical de la remolacha, virus del enrollamiento de hoja de la patata, virus del enrollamiento de la hoja de la vid, virus del enrollamiento de las hojas apicales de la Solanum, virus de la fasciación de la patata, virus del enanismo amarillo de la patata, virus del bronceado del tomate, virus del moteado de la patata andina, virus del mosaico aucuba de la patata, virus del mosaico de la alfalfa, virus del mosaico de la patata silvestre, virus del mosaico del tomate, virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico Sowbane, virus del mosaico del pepino, virus del mosaico del maíz, virus del mosaico del tabaco, virus del mosaico amarillo de la patata, virus de la cuchara del tomate, virus del amarilleamiento de las venas de la patata, virus de amarilleamiento de la patata, virus M de la patata, virus del mosaico del castaño, virus S de la patata, virus T de la patata, virus U de la patata, virus V de la patata, virus X de la patata, y virus Y de la patata.

55 El 4-PBA también se puede usar para mejorar la resistencia de las plantas a los nematodos patógenos. Los ejemplos de dichos nematodos incluyen, los nematodos fitopatógenos de los géneros *Aphelenchoides*, *Achlysiella*, *Anguina*, *Aulosphora*, *Bursaphelenchus*, *Ditylenchus*, *Discocricconemella*, *Globofera*, *Heterodera*, *Helicotylenchus*, *Hirschmanniella*, *Longidorus*, *Meloidogyne*, *Nacobbus*, *Paratrichodorus*, *Pratylenchus*, *Radopholus*, *Rotylenchulus*, *Trichodorus*, *Tylenchorhynchus*, *Scutellonema* y *Xiphinema*.

60 Por lo tanto, las enfermedades de las plantas que se pueden prevenir incluyen cualquier enfermedad causada por un agente fitopatógeno tal como los mencionados anteriormente.

65 Plantas

El método descrito en el presente documento se puede aplicar a una amplia variedad de plantas, incluyendo las plantas de grandes cultivos, plantas hortícolas, flores y árboles.

En particular, el método se puede aplicar a plantas dicotiledóneas, tales como en especial las malváceas (p. ej., algodón, etc.), solanáceas (p. ej., tabaco, tomate, patata, berenjena, etc.), cucurbitáceas (p. ej., melón, pepino, sandía, calabaza, etc.), crucíferas o brasícáceas (p. ej., colza, mostaza, etc.), compuestas (p. ej., achicoria, etc.), umbelíferas (p. ej., zanahoria, comino, etc.) o rosáceas (en particular, árboles y arbustos cuyos frutos son de importancia económica), o monocotiledóneas, como por ejemplo en especial cereales (p. ej., trigo, cebada, avena, arroz, maíz, etc.) o liliáceas (p. ej., cebolla, ajo, etc.).

Preferiblemente, el 4-PBA se aplica a una planta que pertenece a la familia de malváceas (p. ej., algodón, cacao, quingombó, etc.), a la familia de solanáceas (p. ej., tabaco, tomate, patata, berenjena, etc.), a la familia de rubiáceas (p. ej., café, etc.), a la familia de poáceas o gramíneas (p. ej., arroz, maíz, trigo, cebada, avena, centeno, mijo, caña de azúcar, etc.) o a la familia de vitáceas (p. ej., vid, etc.).

El 4-PBA se puede aplicar a una planta transgénica. Se entiende por "planta transgénica" una planta que se ha obtenido mediante técnicas de manipulación genética. Más específicamente, una planta transgénica es una planta en la que al menos una célula contiene secuencias de nucleótidos exógenas introducidas por intervención humana. Típicamente, las plantas transgénicas expresan secuencias de ADN que confieren a estas plantas uno o más caracteres diferentes de los de las plantas no transgénicas de la misma especie.

III - Uso del ácido 4-fenilbutírico como agente antimicrobiano

Los autores de la presente invención han puesto en evidencia un efecto antibacteriano del 4-PBA sobre ciertas bacterias fitopatógenas. Por "antibacteriano" se entiende que se indica en el presente documento una sustancia que mata (efecto bactericida) y/o que ralentiza (efecto bacteriostático) el crecimiento y/o multiplicación de bacterias.

Por consiguiente, se describe en el presente documento el uso del 4-PBA, o una de sus sales, como agente antimicrobiano para la prevención y/o tratamiento de enfermedades de las plantas causadas por fitopatógenos. Como se usa en el presente documento, el término "antimicrobiano" se refiere a una sustancia que mata y/o inhibe el crecimiento y/o la multiplicación de microorganismos.

Las enfermedades de las plantas que en principio se pueden tratar por un método descrito en el presente documento incluyen cualquier enfermedad causada por un agente fitopatógeno que es destruido y/o cuyo crecimiento es inhibido por el 4-PBA o una de sus sales.

En particular, el 4-PBA, o una de sus sales, se puede usar para tratar una enfermedad causada por una bacteria de la especie *Xanthomonas campestris*, que pertenece en particular a los patovares *armoraciae*, *begoniae A*, *begoniae B*, *campestris*, *carotae*, *corylina*, *dieffenbachiae*, *hederae*, *hyacinthi*, *juglandis*, *malvacearum*, *musacearum*, *nigromaculans*, *pelargonii*, *phaseoli*, *poinsetticola*, *raphani*, *sesami*, *tardicrescens*, *translucens* o *vesicatoria*.

Debido a sus propiedades antimicrobianas, el 4-PBA, o una de sus sales, puede encontrar aplicación en muchos campos donde se busca la ausencia de contaminación microbiana, en particular bacteriana y/o viral. Así, por ejemplo, el 4-PBA, o una de sus sales, puede encontrar aplicación en el campo de los productos de mantenimiento e higiene como agente desinfectante. El término "desinfectante" como se usa en el presente documento indica una sustancia que mata y/o inhibe el crecimiento y/o la reproducción de microorganismos en la superficie de objetos inanimados. Dichos objetos pueden ser, por ejemplo, instrumentos médicos; suelos, superficies, muebles o dispositivos de laboratorio o sitios de operación; suelos, superficies, muebles o dispositivos en hogares particulares o en instalaciones públicas o industriales.

También se describe en el presente documento el uso del 4-PBA, o de una de sus sales, como agente desinfectante, por ejemplo, en un método de limpieza, descontaminación o desinfección de una superficie de un objeto que comprende una etapa de poner la superficie del objeto en contacto con una cantidad eficaz de 4-PBA, o una de sus sales. El 4-PBA, o una de sus sales, se puede incluir en una composición o un producto de limpieza, o puede impregnar una almohadilla o toallita destinada a la limpieza, descontaminación y/o desinfección.

IV - Métodos de uso del ácido 4-fenilbutírico

Se proporcionan también en el presente documento métodos o procedimientos de uso del 4-PBA o de una de sus sales, en donde los fitopatógenos, las plantas y las enfermedades de las plantas son como se han descrito anteriormente.

Se describe por lo tanto en el presente documento un método de mejora de la resistencia de una planta a un agente patógeno, caracterizado porque comprende la aplicación de 4-PBA, o una de sus sales, a plantas y/o suelos que rodean a las plantas.

En particular, el 4-PBA, o una de sus sales, se puede aplicar en una cantidad suficiente (o eficaz) para inhibir la muerte celular hipersensible inducida por el fitopatógeno.

5 El 4-PBA, o una de sus sales, también se puede aplicar en una cantidad suficiente (o eficaz) para prevenir una enfermedad vegetal causada por el fitopatógeno.

10 También se describe en el presente documento un método para destruir un fitopatógeno y/o inhibir el crecimiento de dicho fitopatógeno para la prevención o el tratamiento de una enfermedad de plantas causada por el fitopatógeno, comprendiendo el método la aplicación a la planta o al suelo que rodea la planta, de una cantidad suficiente (o eficaz) de ácido 4-PBA. El fitopatógeno se puede elegir entre bacterias, virus y nematodos.

Aplicación del 4-PBA a las plantas

15 En la implementación del método descrito en el presente documento, la aplicación del 4-PBA, o una de sus sales, se puede llevar a cabo por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la aplicación puede hacer por tratamiento del suelo o en el suelo (por riego, inyección o pulverización); por tratamiento de sustratos de cultivo (mantillo, compost ...); por tratamiento con disoluciones nutritivas o irrigación (sistema de goteo o por aspersión); por tratamiento de las partes aéreas de la planta (por riego o pulverización, o por fumigación en el caso de cultivos de invernadero); por tratamiento de semillas u otros materiales de propagación (por ejemplo, espolvoreo de tubérculos o plantas; por remojo de bulbos, frutos, esquejes o plantas; por lavado de frutos o por tratamiento de granos almacenados.

20 Por "partes aéreas de una planta" se entiende la porción de la planta comúnmente conocida como follaje, y que se encuentra por encima del suelo. En general, la parte aérea o el follaje de una planta comprende las hojas, tallos, flores y frutos. El término "fruto" en el presente documento tiene su definición usada en botánica, y por lo tanto designa el órgano vegetal que contiene una o más semillas. El término "fruto", por lo tanto, también incluye las hortalizas.

25 En función de la pareja fitopatógeno/planta y del efecto deseado (es decir, mejora de la resistencia de la planta y/o efecto antimicrobiano), el experto en la técnica sabe cómo determinar el modo o modos de aplicación más adecuados.

30 El experto en la técnica también sabe determinar la o las dosis óptimas de 4-PBA, o de una de sus sales, que se aplicarán para obtener el resultado deseado. De manera general, la dosis aplicada corresponde a una concentración que no es tóxica para el hombre y el medio ambiente. En ciertas realizaciones, el 4-PBA, o una de sus sales, se aplica por pulverización a las plantas o partes de plantas a tratar. En estas realizaciones, el 4-PBA, o una de sus sales, se aplica preferiblemente en una dosis que va de 0,0005 a 3 kg/ha, más preferiblemente que va de 0,001 a 2 kg/ha, y más preferiblemente todavía de 0,005 a 1 kg/ha.

35 El 4-PBA, o una de sus sales, se puede aplicar antes de la emergencia y/o después de la emergencia de la planta. Las expresiones "antes de la emergencia de la planta" y "antes del despunte de la planta" se usan en el presente documento indistintamente y designan el período después de la siembra antes de que la planta cultivada salga de la tierra. Las expresiones "después de emergencia de la planta" y "después de despunte de la planta" se usan en el presente documento indistintamente y designan el período en que la planta cultivada ha salido de la tierra.

40 Alternativa o adicionalmente, el 4-PBA, o una de sus sales, se puede aplicar después de cosechar la planta o sus frutos, para mejorar la estabilidad de almacenamiento de la planta o los frutos.

45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la descripción tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un especialista ordinario en el campo al que pertenece esta invención.

Ejemplos

50 Los siguientes ejemplos describen algunas realizaciones de la presente invención. Sin embargo, se entiende que los ejemplos se presentan solo con fines ilustrativos y de ninguna manera limitan el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Efecto inhibitor del 4-PBA sobre la muerte celular hipersensible

55 El efecto del 4-PBA sobre la muerte celular de naturaleza hipersensible se ha probado en varios patosistemas, que incluyen los presentados en las figuras 1 y 2, a saber, *Gossypium hirsutum/Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* y *Arabidopsis thaliana/Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, respectivamente. Otros datos, aunque no se presentan, confirman las propiedades del 4-PBA contra la muerte celular cuando este se aplica a los tejidos vegetales. Estos últimos datos se refieren a la muerte celular hipersensible inducida en el tabaco por un inductor de origen fúngico, la criptogeína y la muerte celular hipersensible de tipo no huésped en el tabaco que interacciona con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Materiales y métodos

5 Se preparó una disolución madre de 4-PBA (10 mM) de forma extemporánea disolviendo el polvo en agua destilada estéril. Para permitir la disolución completa del 4-PBA, la disolución se calentó a 50°C durante 10 minutos.

10 Las bacterias *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Xcm, raza 18) se cultivaron durante la noche en medio rico en nutrientes (King B). Después de sedimentación por centrifugación, estas últimas se lavaron con agua destilada estéril antes de volver a suspenderlas en una concentración de 10⁸ ufc/ml. La resuspensión de las células se hace en agua destilada estéril o en una disolución de 4-PBA 2 mM. Estos dos tipos de suspensiones se infiltraron en cotiledones de algodón (*Gossypium hirsutum*) en cada lado de la nervadura central para comparar. Los síntomas macroscópicos observados 4 días después de la inoculación se presentan en la figura 1. Este experimento se repitió 2 veces con resultados comparables.

15 Se cultivaron bacterias (*Pst*, cepa avirulenta DC3000 ::AvrRpt2) durante la noche en medio rico en nutrientes (King B). Después de sedimentación por centrifugación, estas últimas se lavaron con agua destilada estéril antes de volver a suspenderlas en una concentración de 10⁷ ufc/ml. La resuspensión de estas células se hace en agua destilada estéril o en una disolución de 4-PBA 1 mM. Estas suspensiones después se infiltraron en las hojas de la roseta de *Arabidopsis thaliana*. Los síntomas macroscópicos se siguieron durante un período de 6 días después de la inoculación. Este experimento se repitió 2 veces con resultados comparables.

Resultados

25 Los resultados relativos a la muerte celular inducida por la bacteria Xcm (cepa avirulenta raza 18) en los cotiledones del algodón se presentan en la figura 1. Muestran claramente que el 4-PBA reprime fuertemente los síntomas hipersensibles (flechas en el lado izquierdo de la figura 1) normalmente inducidos por la infiltración de la bacteria en las hojas cotiledonales del algodón (flechas en el lado derecho de la figura 1).

30 Los resultados relativos a la muerte celular inducida por la bacteria Pseudomonas en las hojas de *Arabidopsis thaliana* se presentan en la figura 2. Muestran que el 4-PBA también es capaz de eliminar los síntomas hipersensibles normalmente inducidos por la infiltración de la bacteria en las hojas de *A. thaliana*.

Ejemplo 2: Efectos del 4-PBA en el retículo endoplasmático vegetal

35 El efecto del 4-PBA en el retículo endoplasmático de células vegetales se ha probado en dos tipos de plantas: *Arabidopsis thaliana* y tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Materiales y métodos

40 Las disoluciones de 4-PBA usadas en los experimentos descritos a continuación se prepararon como se describe en el Ejemplo 1.

45 La infección por *Pst* (cepa avirulenta DC3000::cepa AvrRpt2) se llevó a cabo en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Se añadió una condición adicional correspondiente a la infiltración de una disolución de 4-PBA (1 mM) sola en las hojas de *A. thaliana*.

50 Se recogieron muestras 44 horas después de la inoculación, se congelaron en nitrógeno líquido y después se almacenaron a -80°C hasta la extracción de los ARN totales. Los ARN totales se volvieron a transcribir para sintetizar los ADNc. Estos ADNc se usaron como molde en experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real. Los cebadores específicos de los genes que codifican la "proteína de unión" (BiP1.2 y BiP3), calnexina 1 (CNX1) y calreticulina 1 (CRT1) se diseñaron para determinar la expresión de estos genes. La expresión de los genes de interés se ha normalizado con respecto a la de un gen de actina. Estos experimentos se repitieron una vez, incluyendo un duplicado por experimento.

55 El intervalo de concentraciones presentado en la figura 4A se realizó por infiltración en hojas de tabaco de disoluciones de 4-PBA 0,5; 1; 2,5 y 5 mM. Los síntomas macroscópicos se evaluaron 48 horas después de la infiltración. También se recogieron muestras en los tiempos indicados en la figura 4B y se trataron como se ha descrito en lo que antecede para ser analizadas por PCR cuantitativa en tiempo real. Los cebadores específicos del conjunto de 9 genes que codifican las proteínas BiP se han diseñado para este propósito.

60 Resultados

65 Los resultados obtenidos para *A. thaliana* se presentan en la figura 3. Muestran claramente que el 4-PBA, cuando se infiltra solo en las hojas de *Arabidopsis*, permite inducir significativamente la expresión de genes que codifican proteínas chaperonas (es decir, BiP1,2 y BiP3, CNX1 y CRT1) localizadas en el retículo endoplasmático. Por otro lado, la infiltración de la bacteria *Pst* sola induce una expresión menor de 4 de los genes considerados, lo que sugiere un

estrés del retículo en respuesta a la infección. Finalmente, se puede observar un efecto sinérgico del 4-PBA y la infección por la bacteria para los genes BiP1,2, CNX1 y CRT1. Todos estos datos sugieren que el 4-PBA suprime la muerte celular hipersensible inducida por Pst al aumentar la capacidad de "plegamiento" del retículo endoplásmico en *A. thaliana*.

5 Los resultados obtenidos para el tabaco se presentan en la figura 4. Demuestran que el 4-PBA en las concentraciones usadas para inhibir la muerte celular hipersensible en las plantas (figuras 1 y 2) o el crecimiento bacteriano (figura 5) no es tóxico para las células vegetales (figura 4A, flecha). Además, estos resultados muestran claramente que el 4-PBA, como es el caso en arabisopsis, es capaz de inducir la expresión de los genes BiP en el tabaco (figura 4B), lo que sugiere aquí también que el 4-PBA actuaría sobre la capacidad de "plegamiento" del retículo endoplásmico para reprimir la muerte celular hipersensible inducida por la criptogeina en el tabaco (datos no mostrados).

15 Ejemplo 3: Propiedades antibacterianas del 4-PBA

20 Materiales y métodos

El efecto del 4-PBA sobre las bacterias fitopatógenas se ha probado in vitro en la cepa bacteriana *Xcm* raza 20. La cepa se cultivó en medio líquido King B en presencia o ausencia de 4-PBA. La disolución de 4-PBA se preparó de forma extemporánea como se ha descrito antes. El medio nutritivo se inoculó usando reservas de glicerol o usando colonias bacterianas recién cultivadas en medio sólido. El medio nutritivo se complementó con la disolución de 4-PBA con el fin de alcanzar una concentración final de 1 mM (volumen final de 10 ml). Los testigos se complementaron con un volumen de agua comparable. Los tubos después se incubaron durante la noche (aproximadamente 16 horas) con agitación suave a 30°C. Después el crecimiento bacteriano se midió por nefelometría midiendo la absorbancia de una parte alícuota de los cultivos bacterianos a 600 nm. Este experimento se llevó a cabo tres veces. Cada experimento contenía un triplicado técnico por condición, es decir condición con 4-PBA y condición sin 4-PBA. Todos los experimentos dieron resultados comparables. Se obtuvieron datos similares para la cepa *XCM* raza 18 (datos no mostrados).

30 Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 5. Muestran claramente que la presencia de 4-PBA en el medio de cultivo inhibe fuertemente el crecimiento de bacterias *X. campestris* pv. *malvacearum* (raza 20). Estos datos sugieren que el 4-PBA tiene al menos propiedades bacteriostáticas e incluso bactericidas.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de destrucción de un fitopatógeno y/o de inhibición del crecimiento de un fitopatógeno para prevenir o tratar una enfermedad vegetal causada por dicho fitopatógeno, que comprende la aplicación a la planta o al suelo que la rodea, de una cantidad suficiente de ácido 4-fenilbutírico, o de una de sus sales, caracterizado por que el fitopatógeno se selecciona de bacterias.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que el fitopatógeno es biótrofo.
- 10 3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que el ácido 4-fenilbutírico, o una de sus sales, se aplica antes de la emergencia de la planta.
- 15 4. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que el ácido 4-fenilbutírico, o una de sus sales, se aplica después de la emergencia de la planta.
5. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que el ácido 4-fenilbutírico, o una de sus sales, se aplica a las partes aéreas de la planta, a las raíces de la planta, a las semillas, tubérculos o bulbos de la planta y/o a los frutos o granos de la planta.
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la planta pertenece a la familia de Malváceas, a la familia de Solanáceas, a la familia de Rubiáceas, a la familia de Poáceas o Gramíneas o a la familia de Vitáceas.

Figura 1

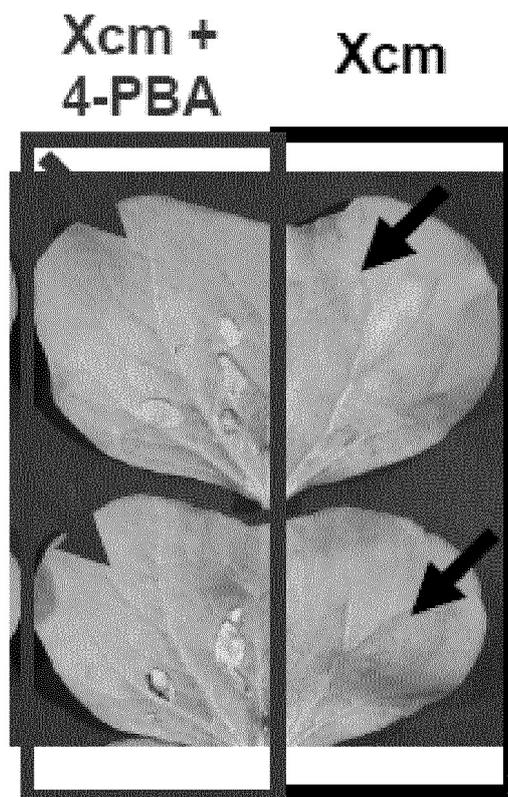


Figura 2

2 días

6 días

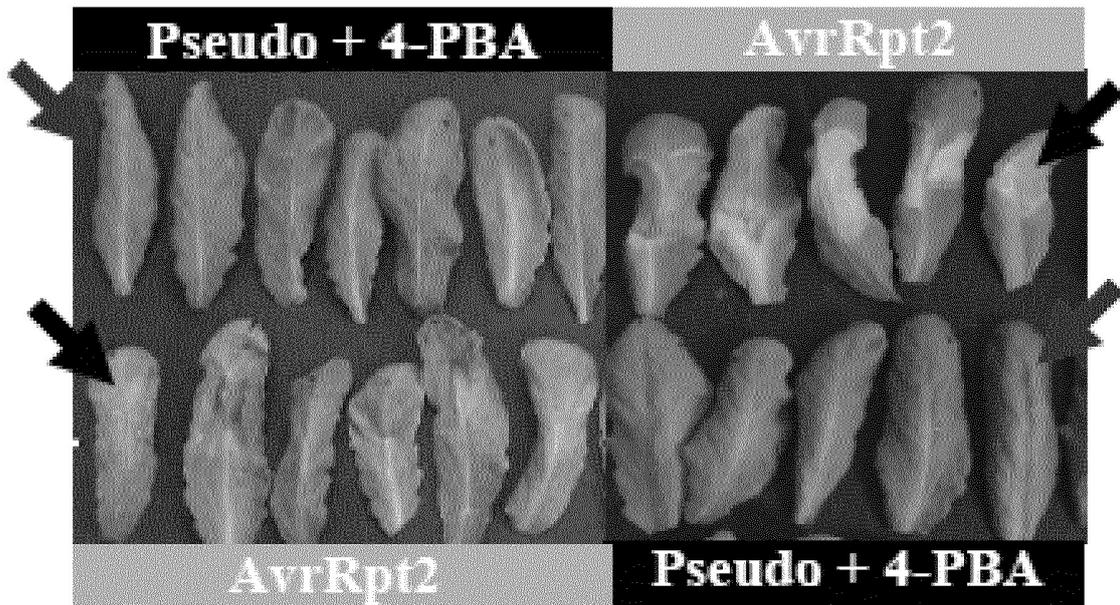


Figura 3

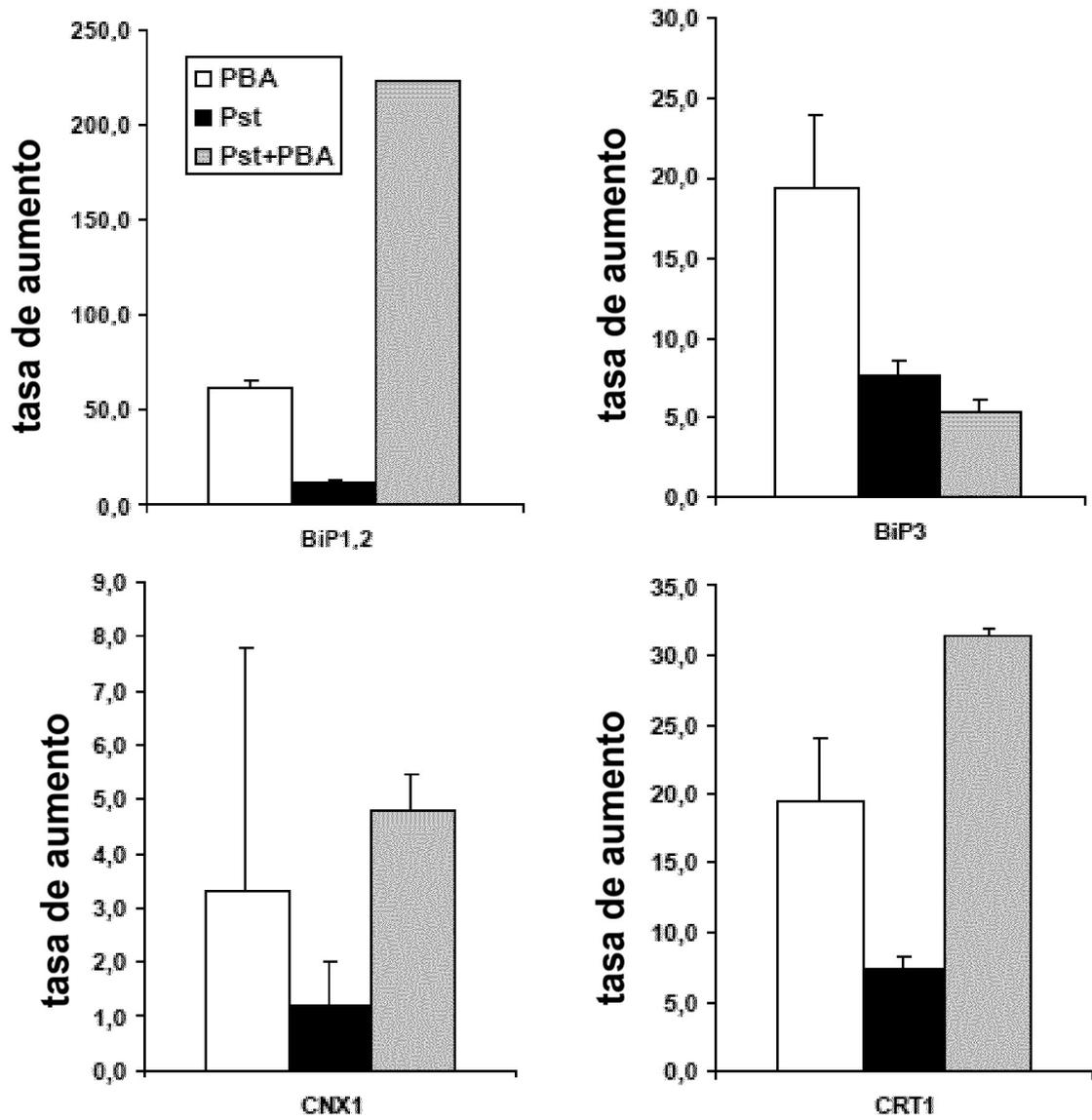
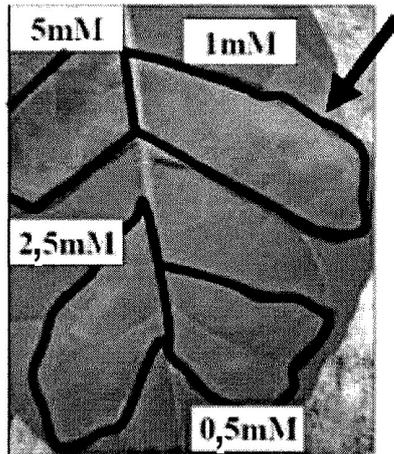


Figura 4 / 5

A



B

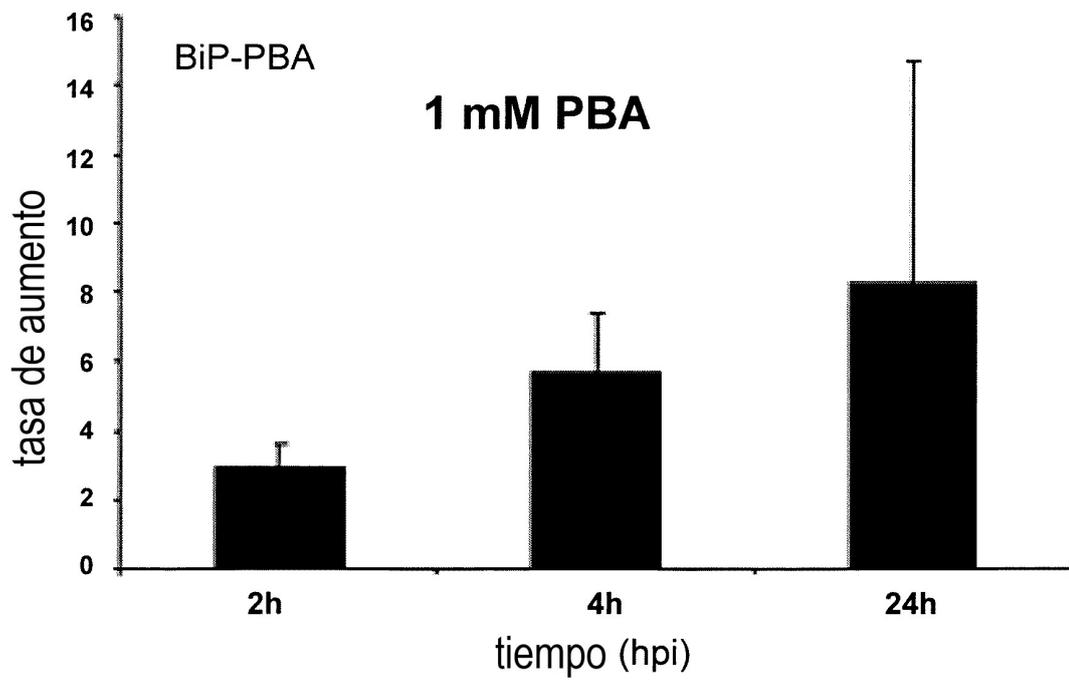


Figura 5

