



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 313**

51 Int. Cl.:
A01N 43/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03744887 .5**

96 Fecha de presentación : **27.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1487270**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54 Título: **Utilización de un polisacárido para aumentar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico.**

30 Prioridad: **27.03.2002 FR 02 03849**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.02.2010

73 Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cédex 16, FR**

72 Inventor/es: **Lienart, Yvette, Janine y
Heyraud, Alain, Charles, Abel**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Utilización de un polisacárido para aumentar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico.

5 La presente invención tiene por objeto nuevas utilizaciones de compuestos que comprenden una estructura osídica que contiene unas cadenas X, F y G en el campo fitosanitario.

Las paredes celulares de los frutos y de los vegetales están formadas por polisacáridos, y principalmente la pectina, la celulosa y el xiloglucano que interviene en la disposición de las paredes (Levy S *et al.*, Plant J. 1997, 11(3): 373-86). El xiloglucano se encuentra asimismo en gran cantidad en el endosperma de las semillas de las dicotiledóneas.

10 El xiloglucano es un polímero de 1,4- β -glucano sustituido de manera diferente según su origen. En las dicotiledóneas, las sustituciones de las cadenas lineales de 1,4- β -D-glucano implican lo más frecuentemente unas ramificaciones de tipo 1,6 α -D-xilosilo, o 1,6 α -D-xilosa 1,2 β -D-galactosil, y se puede asociar, en posición terminal, a la galactosa, fucosa, o bien una ramificación lateral de tipo 1,6 α -D-xilosa 1,2 β -D-galactosa 1,2 α -L-fucosil. Todavía en las dicotiledóneas, el residuo fucosa está ausente del endosperma, y se puede sustituir por el residuo α -L-arabinosa, por ejemplo en ciertas solanáceas. El xiloglucano de las monodicotiledóneas difiere del de las dicotiledóneas por un índice más bajo de sustitución por los residuos xilosa, galactosa y por la ausencia de fucosa. El xiloglucano forma, con las microfibras de celulosa, unas estructuras puenteadas que constituyen la estructura y aseguran la flexibilidad de la pared celular de los vegetales (Pauly M, Albersheim P, Darvill A, York WS (1999) Plant J, 20 (6): 629-39).

20 El xiloglucano es un sustrato de endoxiloglucanasas (Vincken JP, Beldman G, Voragen AG Carbohydr Res (1997) 13, 298(4):299-310) o de xiloglucano endotransglucosilasa (Steele NM, Fry SC, Biochem J (1999) 15, 340, 1, 207-211), a saber, de actividades enzimáticas apropiadas para modificar la estructura de las paredes celulares durante la elongación celular, en periodo de germinación, de fructificación por ejemplo y que dependen de hormonas, en particular de auxinas (Hetherington PR y Fry S. (1993) Plant Physiology, 103, 987-992), y de giberelinas (MacLachlan G y Brady C (1994) Plant Physiol 105,965-974).

30 El xiloglucano, en particular un oligómero fucosilado, el nonasacárido XXFG (descrito en Fry *et al.* (1993) Physiologia Plantarum, 89, 1-3), es muy conocido por su efecto antiauxínico (Mac Dougall CJ y Fry SC (1989) Plant Physiol 89, 883-887). Al contrario, unos oligómeros sin fucosa pero con galactosa tales como los oligómeros XXLG y XLLG tienen un efecto auxínico (Mc Dougall GJ y Fry SC (1990) Plant Physiology 93, 1042-1048). Ozeretskovskaya *et al.* relatan los efectos del xiloglucano y de sus derivados sobre el crecimiento de las plantas, la morfogénesis y las respuestas a los patógenos, y el documento WO 01/00025 describe la utilización de glucuronanos y de glucurónidos derivados para la adaptación de plantas a unos estrés abióticos.

35 Por otro lado, numerosas señales generan unas especies activadas de oxígeno (se habla asimismo de “burst oxidativo”). Unas especies activadas de oxígeno son muy conocidas por ser liberadas durante unas interacciones planta-patógeno. Unos oligosacáridos de diversos orígenes (ácido poligalacturónico, quitosano, O-glicanos, etc.) han sido clasificados por su capacidad para generar un “burst oxidativo” (Low PS y Heinsteins PF (1986) Arch. Biochem. Biophys. 249, 472-479; Rogers KR., Albert F, y Anderson AJ (1988) Plant Physiol 86, 547-553; Apostol I, Heinsteins PF y Low PS (1989) Plant Physiol 90, 109-116; Vera-Estrella R, Blumwald E y Higgins VJ (1992) Plant Physiol. 1208-1215; Bolwell GP, Butt VS, Davies DR y Zimmerlin A. (1995) Free Rad. Res. Comm. 23, 517-532; Orozco-Cardenas M y Ryan CA (1999) PNAS, 25, 96, 11, 6553-655; Nita-Lazar M, Iwahara S, Takegawa K, Liénart Y (2000) J Plant Physiol, 156, 306-311). Las enzimas NAD(P)H oxido-reductasas para la liberación de anión superóxido (Van Gestelen PV, Asard A, Caubergs RJ (1997) Plant Physiol 115, 543-550) y peroxidadas para la formación de peróxido o de anión superóxido o de radicales OH, están implicadas (Baker CJ y Orlandi EW (1995) Ann. Rev. Phytopathol, 33, 299-321; Chen SX y Schopfer P (1999) Eur Biochem 260, 726-735). Otras señales (ácido salicílico, jasmonatos, cGMP, NO...) generan asimismo un “burst” (Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J, Klessig DF (1995) Proc Natl Acad Sci USA, 92,4134-4137; Voros K, Feussner I, Kuhn H, Lee J, Graner A, Lobler M, Parthier B, Wasternack C Eur J Biochem (1998) 15, 251, 36-44; Durner J, y Klessig J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Proc Natl Acad Sci USA, 95, 10328-10333; Durner D et Klessig DF (1999) Current Opinion in Plant Biology, 2, 369-374).

55 Unas condiciones extremas del entorno (sequedad, frío, UV, salinidad, etc.) inician el mismo efecto.

El papel principal de H₂O₂ en la generación del “burst” así como en la regulación del estrés oxidante se basa:

- en su formación por dismutación a partir del anión superóxido (Bolwell GP, Davies DR, Gerrish C, Auh CK y Murphy TM (1998) Plant Physiol 116,1379-1385),
- en su utilización en unas secuencias del metabolismo de los ácidos grasos C₁₈ (para la peroxidación de lípidos (Koch E, Meier BM, Eiben H-G, Slusarenko A (1992) Plant Physiol 99, 571-576) o para la síntesis de octadecanoides y de sus derivados, de los cuales algunos tales como los metil-jasmonatos son unos metabolitos con función hormonal,
- en su función de sustrato para unas enzimas peroxidasa y catalasa, propiedad que limita la acumulación de peróxido tóxico para la célula (Baker CJ, Harmon GL, Glazener JA y Orlandi EW (1995) Plant Physiol, 108, 353-359).

Las especies activadas de oxígeno, el anión superóxido en particular, controlan diferentes vías metabólicas. Intervienen asimismo en:

- la biosíntesis de las poliaminas: unas monoaminas se oxidan en aldehídos con producción de NH_3 y de peróxido. La oxidación de la L-arginina por la nitrito-sintasa desemboca en la formación de un precursor de poliamina (L-citrulina),
- la síntesis del etileno,
- la síntesis de las giberelinas. Más de 20 oxidasas están implicadas en la regulación de la biosíntesis de las giberelinas.

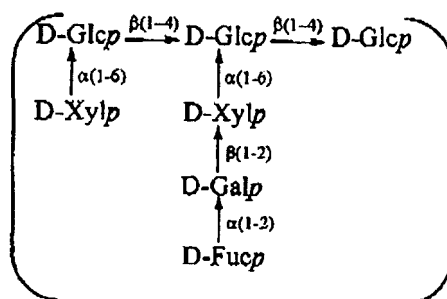
Las especies activadas de oxígeno intervienen en unas etapas de transducción de señales, porque están asociadas a la actividad de unión de receptores o a la actividad de enzimas de transducción (Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K y Scheel D (1997) Proc Natl Acad Sci USA 29, 94, 9, 4800-4805; Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Proc Natl Acad Sci USA, 95, 10328-10333).

Intervienen en la regulación del potencial redox celular por medio de grupos tioles (conversión GSSG-GSH, cistina-cisteína, etc.). Para ello, controlan unos procesos de senescencia que se manifiestan en ciertas fases de la floración y de la fructificación en diferentes órganos.

El "burst" oxidativo interfiere con el metabolismo hormonal, el potencial más competente para regular los estados de floración y de fructificación (en particular su inicio y su duración están programados por una balanza hormonal (relación auxina/citoquina por ejemplo), y las especies activadas de oxígeno, incluyendo el peróxido, controlan la síntesis de las poliaminas).

Uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar nuevas composiciones que se pueden utilizar en el campo fitosanitario y más particularmente para luchar contra el estrés abiótico en las plantas.

La presente invención se refiere a la utilización del compuesto XFG de fórmula



cuyo residuo de glucosa en posición terminal está reducido o no,

en el ámbito de la adaptación de las plantas a un estrés abiótico, tal como la adaptación al frío, o a un estrés hídrico tal como la sequedad, la humedad o la salinidad.

La invención se refiere asimismo a la utilización del compuesto XFG, caracterizada porque comprende una etapa de tratamiento de las plantas con por lo menos un compuesto tal como se ha definido anteriormente, en particular por irrigación del suelo sobre el que se cultivan estas plantas, con una composición que comprende dicho compuesto, o por revestimiento de las semillas con dicha composición, o por pulverización foliar en campo de dicha composición sobre las plantas a tratar.

Ventajosamente, las composiciones mencionadas anteriormente que comprenden por lo menos un compuesto tal como se ha definido anteriormente y utilizadas en el ámbito de la presente invención, se presentan como insumos agrícolas en forma sólida (en particular polvo, gránulos, pastillas), o en forma líquida (en particular en disolución acuosa), asociado o no a otros componentes de insumos agrícolas.

Entre las plantas susceptibles de ser tratadas en el ámbito de la presente invención, se citarán principalmente las plantas agrónomicamente útiles, tales como la vid, los árboles frutales (en particular manzano, peral, nogal), los cereales (en particular arroz, cebada), las oleaginosas (en particular soja, colza, girasol), las proteaginosas (en particular los guisantes), y los cultivos de hortalizas (en particular los tomates).

ES 2 333 313 T3

La invención se refiere asimismo a dicha utilización de compuestos definidos anteriormente, tal como se obtienen:

- a partir de plantas, en particular mediante la extracción de semillas, hojas, raíces, frutos, en particular a partir de manzanas (*Malus Malus* L., *Rosaceae*), en particular según el método descrito en Vincken JP, Beldman G, Niessen WMA, Voragen AGJ (1996) Carbohydrate Polymers, 29, 1, 75-85; Spronk BA, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE, Vincken JP, Voragen AG, Kamerling JP, Vliegthart JF (1997) Carbohydrate Research, 305, 2, 233-242; el procedimiento se desarrolla en 3 etapas: a) extraer el polímero xiloglucano de la biomasa mediante tratamiento alcalino seguido de una despectinización por vía enzimática; b) hidrolizar el polímero con la ayuda de celulasas y más particularmente de endo 1-4 β D glucanasa aislada de *Trichoderma viride*; c) purificar los oligómeros mediante cromatografía de exclusión sobre Bio-Gel P-2 seguida de una cromatografía de intercambio de aniones sobre un sistema Dionex.

- a partir de suspensiones celulares de plantas, en particular de

- *Rubus fruticosus* L. en particular según Joseleau JP, Cartier N, Chambat G, Faik A, K Ruel (1992), Biochimie, 74,81-88;
- *Rosa* sp. en particular según Fry SC (1989) J. Exp. Bot. 40, 1-11; Mc Dougall, G.J. Fry SC (1991) Carbohydrate Research 219, 123-132,

desarrollándose el procedimiento en 3 etapas: a) extraer el polímero xiloglucano de las paredes celulares mediante tratamiento alcalino acoplado a una despectinización por vía química o bien por desproteización acoplada a un tratamiento alcalino; b) hidrolizar el polímero con la ayuda de celulasas y más particularmente de endo 1-4 β D glucanasa aislada de *Trichoderma viride*; c) purificar los oligómeros mediante cromatografía de exclusión sobre Bio-Gel P-2 seguida de un fraccionamiento por cromatografía de intercambio de aniones sobre un sistema Dionex o mediante cromatografía de exclusión sobre Bio-Gel P-2, seguida de un fraccionamiento mediante cromatografía en fase inversa sobre columna C₁₈ o por intercambio de aniones sobre un sistema Dionex; las celulasas pueden ser unas enzimas obtenidas mediante la fermentación de cepas bacterianas genéticamente modificadas o no, o ser obtenidas por vía recombinante.

La invención tiene asimismo por objeto la utilización mencionada anteriormente de compuestos definidos anteriormente, tal como se obtienen:

- * por síntesis química, en particular según el método descrito en Pavlova ZN, *Ash AO, Vnuchkova VA, Babakov AV, Torgov VI, Nechaev OA, Usov AI, Shibaev VN (1992) Plant Science 85, 131-134; o en base a los trabajos de Watt D. K., Brasch D. J, Larsen D. S, Melton L. D, Simpson J Carbohydrate Research, 325, 2000, 300-312,
- * por síntesis quimioenzimática, en particular a partir de los oligómeros de xiloglucano modificados por actividad endotransglicosilasa (β -D-glucosidasa, α -(β) L-xilodidasa, β -D-galactosidasa) según York W. S., Harvey L. K., Guillen R., Alberheim P., Darvill A., Carbohydrate Research, 1993, 248, 285-301 o por actividad endotransxiloglucanasa según G. Maclachlan, C. Brady, Plant Physiology, 105, 1994, 965-974) o por actividad fucosiltransferasa (s) de origen vegetal o animal según Baydoun E. A.-H., Abdel-Massih R. m, Dani D, Rizk S, Bret C. T, Journal of Plant Physiology, 158, 2000, 145-150; Faik A, Bar Peled M, DeRocher AE, Zeng W, Perinn RM, Wilkerson C, Raikhel NV, Keegstra K. J. Biol Chem, 2000, 275,20,
- * por vía recombinante,
- * por hidrólisis del polímero xiloglucano o a partir de oligómeros tales como se obtienen de polímeros o de glicanos que representan la parte glicánica de glicoproteínas a partir de una degradación enzimática de xiloglucanos presentes en unas biomásas tales como:

1/ los frutos y vegetales, y más particularmente, pimientos, tomates, patatas, olivas y manzanas, o residuos procedentes de estas biomásas ("pomaces", etc.) según los métodos descritos en:

Spronk B. A., Rademaker G. J., Haverkamp J., Thomas-Oates J. E., Vincken J. P., Voragen A. G., Kamerling J. P., Vliegthart J. F., Carbohydrate Research, 305, 1997, 233-242,

Renard C.M.G.C., Lomax J. A., Boon J. J., Carbohydrate Research, 232, 1992, 303-320,

Vincken J. P., Beldman G., Niessen W.M.A., Voragen A.G.J., Carbohydrate Polymers, 29 (1996) 75-85;

2/ las suspensiones celulares (*Rubus fruticosos*, *sycomore*) según:

Joseleau J. P., Cartier N., Chambat G., Faik, A., Ruel K., *Biochimie*, 74 (1992) 81-88,

Augur C., Yu L., Ogawa T., Sinay P., Darvill A. G., Albersheim P., *Plant Physiology*, 99 (1992) 180-185;

3/ mediante fermentación de microorganismos (bacterias, hongos, etc.) genéticamente modificados o no;

4/ las semillas (*capuchina*, *Hymenaea*, etc.) según McDougall G.J., ry S.C., *Plant Physiology*, 89 (1989) 883-887;

5/ las hojas, y más particularmente las de *Hymenaea courbaril*, Busato A.P., Vargas-Rechia C.G., Reicher F., *Phytochemistry*, 58 (2001) 525-531,

utilizando unas enzimas que son:

- unas xiloglucanasas (García-Garrido J. M., Rejon-Palomares A., Ocampo J. A., García-Romera I *Mycol. Res.*, 103 (1999) 882-886),

- unas celulasas, y más particularmente unas β -1,4-glucanasas de *Trichoderma viride* (Vincken JP., de Keiser A., Beldman G., Voragen A. G., J., *Plant Physiology*, 108, 1995, 1579-1585), de *Trichoderma. Reesei* (Hasper A. A., Dekkers E., van Mil M., van de Vondervoort P.J.L., de Graaff L.H., *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2002, 1556-1560) o de *Aspergillus oryzae* (Kato Y, Matsuda K., *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1980, 1759-1766),

- unas exocelulasas tales como las de *Irpex lacteus*,

siendo dichas enzimas:

- o bien aisladas de cepas bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas o no, o bien obtenidas por vía recombinante (Pauly M, Andersen LN, Kaupinnen S, Kofod LV, York WS, Albersheim P, Darvill A (*Glycobiology* 1999, 9, 1,93-100),

- usadas solas o en mezcla asociadas preferentemente con unas enzimas pectolíticas (poligalacturonasas, pectina esterasas, pectina liasas) según Renard C.M.G.C., Searle-can Leewen M.J.F., Voragen A.G.J., Thibault J.F., Pilnik W., *Carbohydrate Polymers*, 14, 1991, 295-314, o bien sustituidas por unas enzimas de amplio espectro de tipo pectolítico.

La mezcla de oligómeros obtenida por hidrólisis del polímero se fracciona en grado de polimerización (DP) mediante cromatografía de exclusión estérica sobre columna de Bio-Gel, y los oligosacáridos de DP de interés se separan después en función de características estructurales mediante cromatografía de alto rendimiento (HPLC).

Varios sistemas son susceptibles de ser utilizados entre la cromatografía de intercambiador de aniones (HPAEC) o sobre columna DIONEX (Vincken J. P., Beldman G., Niessen W.M.A., Voragen A.G.J., *Carbohydrate Polymers*, 29, 1996, 1, 75-85), y la cromatografía de afinidad sobre fase normal (Kakegawa K., Edashige Y., Ishii T., *Phytochemistry*, 47, 1998, 767-771) o fase inversa (Watt O. K., Brash D. J., Larsen D. S., Melton L. D., *Carbohydrate Polymers*, 39, 1999, 165-180).

La estructura de cada oligosacáridos se confirma a continuación mediante unos métodos espectroscópicos (RMN y espectrometría de masas) (York W. S., van Halbeek H., Darvill A. G., Albersheim P., *Carbohydrate Research*, 200, 1990, 9-31).

La invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente del potencial elicitor de compuestos según la invención en la vid, a saber, del efecto inductor de una resistencia al frío.

Se utilizan para el estudio unas plantas procedentes de diferentes variedades incluyendo la variedad *Pinot noir*. Cada muestra, compuesta por 5 plantas, se trata mediante pulverización foliar en diferentes etapas vegetativas de la escala BBCH con el elicitor xiloglucano: heptasacárido XFG en disolución a dosis variables; la vaporización de 2,5 ml de disolución por planta se lleva a cabo con la ayuda de un vaporizador (desviación de +/- 1%).

Después de la aplicación del elicitor, las plantas han sido expuestas a un estrés frío de intensidad y de duración variable. Después de la exposición al frío, las plantas se colocan en cámara climatizada a 20°C con una alternancia día/noche de 12 h. El aspecto de las hojas se observa a 24 h, 72 h después de la salida del frío. Los efectos del frío se evalúan observando las necrosis foliares inducidas por las heladas y las plantas se conservan durante varios meses para seguir su desarrollo ulterior.

ES 2 333 313 T3

Los resultados sobre 50 plantas y relativos a 10 replicaciones se expresan mediante el índice de protección I_f (%) = $100-P$; siendo P la proporción de hojas que tienen necrosis. Los resultados que se refieren a las plantas de control T tratadas con agua y las plantas elicitadas por el heptasacárido: XFG o XFGol han sido expresados mediante el índice de protección I_f (%) medido 24 h después del estrés.

Resultados

Variedad: *Pinot noir* en la etapa BBCH 13

Temperatura: 3,5°C, duración 180 min.

	T (I_f)	XFG (I_f)	XFGol (I_f)
dosis: 33 mg/l	75	100	100
dosis: 33 µg/l	75	100	100

Por otro lado, se ha observado que la aplicación del elicitor:

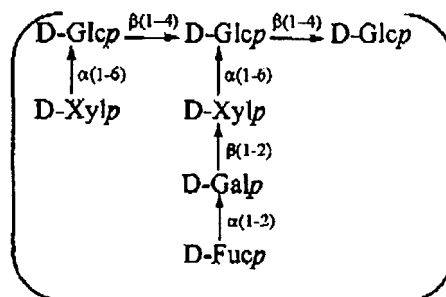
- aporta asimismo un efecto de protección contra las heladas sobre las variedades Chenin, Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Pinot meunier, Merlot, Grolleau,
- no cambia el desarrollo de la vid,
- tiene un efecto protector contra las heladas que se mantiene durante varios días.

Las plantas tratadas por el elicitor xiloglucano a la dosis de 3,3 mg/l resisten al estrés frío que destruye las hojas de los controles tratados con agua: la coloración de las hojas de las plantas elicitadas sigue siendo normal en lugar de cambiar al verde oscuro a partir del deshielo (tal como se observa para los controles tratados con agua), y no aparece ninguna señal de necrosis después de 24 h (tal como se observa para los controles tratados con agua).

Se ha observado que la aplicación del elicitor no aporta ninguna perturbación en la evolución de la planta debido a que el desarrollo de las plantas elicitadas después del estrés frío es comparable al de las plantas de control no expuestas al frío.

REIVINDICACIONES

1. Utilización del compuesto XFG de fórmula



cuyo residuo de glucosa en posición terminal está reducido o no,

en el campo de la adaptación de las plantas a un estrés abiótico, tal como la adaptación al frío, o a un estrés hídrico tal como la sequedad, la humedad o la salinidad.

2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque comprende una etapa de tratamiento de las plantas con por lo menos un compuesto según la reivindicación 1, en particular mediante irrigación del suelo sobre el cual se cultivan estas plantas, con una composición que comprende dicho compuesto, o mediante el revestimiento de las semillas con dicha composición, o mediante pulverización foliar en campo de dicha composición sobre las plantas a tratar.