

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 388**

51 Int. Cl.:

A01N 43/08 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2020** **PCT/EP2020/086690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2021** **WO21122933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2020** **E 20833813 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2024** **EP 4075977**

54 Título: **Uso del ácido deshidroascórbico contra la infección por nematodos en plantas**

30 Prioridad:

20.12.2019 EP 19218568

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

29.10.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE**

72 Inventor/es:

**KYNDT, TINA y
SINGH, RICHARD, RAJ**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 984 388 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 deshidroascórbico contra la infección por nematodos en plantas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de ácido deshidroascórbico (DHA) para proteger plantas contra patógenos, en particular contra infecciones con nematodos. La invención también proporciona composiciones que lo comprenden, métodos para prepararlas, y métodos para controlar enfermedades de las plantas.

10 **Antecedentes de la invención**

La industria agrícola está bajo una presión constante para mejorar eficientemente la producción de alimentos a fin de hacer frente a una demanda de alimentos cada vez mayor. La única forma duradera de satisfacer esa demanda es mediante el aumento de la productividad agrícola a partir de las mismas -o idealmente, incluso reducidas- superficies de tierra cultivable. Se ha estimado que el 80 % de todos los problemas de los cultivos comienzan con problemas de raíces, y el desarrollo saludable de las raíces de las plantas es la clave para mejorar el rendimiento de los cultivos (Root Health - the key to improving yield; Libro blanco, 2011). Las raíces más fuertes y más sanas son más adecuadas para absorber agua y nutrientes, dos de los recursos más críticos. Los sistemas de raíces más robustos ayudan a producir tallos y follaje más fuertes que pueden resistir mejor el estrés ambiental, especialmente en climas difíciles, y en última instancia conducen a una mayor consistencia del rendimiento (EIP-Agri focus group report, 2015). Las plantas están sujetas a múltiples agentes subterráneos que causan enfermedades, incluido el estrés abiótico tal como la sequía, y el estrés biótico tal como, por ejemplo, los nematodos fitopatógenos, que son responsables de importantes pérdidas económicas en la agricultura.

La remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) es la principal fuente de azúcar en la zona templada, y representa el 20 % de la producción total de azúcar del mundo. Según la Comisión Europea, la UE es el principal productor mundial de azúcar de remolacha, con 16,84 millones de toneladas de producción de azúcar en el año 2016/2017; sin embargo, exporta alrededor del 8 % de su producción de azúcar. Los nematodos fitoparásitos subterráneos causan daños importantes a la producción de remolacha azucarera. En general, las pérdidas de cultivos causadas por los nematodos fitoparásitos ascienden en todo el mundo a al menos 80 mil millones de dólares al año. *Heterodera schachtii* (nematodo del quiste de la remolacha (BCN)) es responsable del 90 % de todas las infestaciones de remolacha azucarera relacionadas con nematodos en todo el mundo. Los BCN son endoparásitos sedentarios que se alimentan de las raíces de su hospedante (Moens *et al.*, 2018). Los nematodos del quiste tienen la capacidad de sobrevivir en el suelo durante muchos años en ausencia de una planta hospedante adecuada (Perry *et al.*, 2018). La presencia de exudados de raíces proporciona una señal para la aparición de huevos dentro de los quistes, lo que hace que los juveniles de segunda etapa (J2) eclosionen e invadan las raíces de la planta hospedante (Moens *et al.*, 2018). La etapa J2 infecciosa invade las plantas principalmente en la zona de alargamiento por encima de las puntas de las raíces (Wyss y Grundler, 1992). Tras la invasión, J2 migra adicionalmente hacia la corteza, en la que inicia una estructura de alimentación (sincitio) en el tejido vascular de la raíz (Sobczak y Golinowski, 2009).

El arroz se ha cultivado como alimento básico durante muchos años, y sustenta aproximadamente a la mitad de la población mundial. Se ha estimado que las pérdidas de rendimiento del arroz debido a los nematodos oscilan entre 10 y 25 % en todo el mundo (Kyndt *et al.*, 2014). *Meloidogyne graminicola* o el nematodo agallador del arroz (RKN) es uno de los nematodos más prevalentes en diversos agrosistemas de cultivo de arroz. Los juveniles de segunda etapa infecciosos (J2) de *M. graminicola* ingresan a la raíz en la zona de alargamiento y se mueven intercelularmente hasta llegar al cilindro vascular en el que inducen la formación de sitios de alimentación que contienen 5-8 células gigantes, conduciendo a agallas de la raíz, preferiblemente en las puntas de las raíces (Kyndt *et al.*, 2014). Una vez establecidas las células gigantes, los nematodos se vuelven sedentarios, comienzan a alimentarse, y mudan tres veces para alcanzar la etapa adulta.

Ante el ataque de patógenos, el sistema inmunológico innato de la planta responde con una serie de mecanismos de defensa locales y sistémicos (Dhankher *et al.*, 2018; Jones y Dangl, 2006). El sistema inmunológico de las plantas puede activarse externamente, por ejemplo mediante patógenos, o mediante la aplicación de análogos hormonales (resistencia sistémica adquirida, dependiente del salicilato (SA)) o mediante sustancias químicas o microorganismos beneficiosos (resistencia sistémica inducida, ISR).

Anteriormente, se ha demostrado que la aplicación radicular de ácido β -aminobutírico (BABA) (Jisha y Puthur, 2016), tiamina (Huang *et al.*, 2016) o silicio (Zhan *et al.*, 2018) mejora el sistema de defensa de la planta de arroz, lo que conduce a una mayor tolerancia o resistencia contra los nematodos parásitos de las raíces. También se ha observado activación de las defensas sistémicas: la aplicación foliar de jasmonato de metilo (MeJA), etefón, el análogo de SA BTH, o COS-OGA (Fytosave®, una mezcla de oligómeros de quitosano (COS) y oligogalacturónidos derivados de pectina (OGA)), puede activar las rutas de defensa de las raíces con eficacia variable (Nahar *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2019).

Varios estudios muestran una correlación negativa entre la cantidad de ácido ascórbico (AA) y la resistencia a los patógenos aéreos. Pavet *et al.*, (2005) demostraron que los mutantes *vtc* (vitamina C) de *Arabidopsis* exhiben una resistencia basal mejorada contra *Pseudomonas syringae*, acompañada de una mayor activación de la muerte celular. Sin embargo, también hay informes sobre el papel del ácido ascórbico en la defensa contra patógenos. Los cultivares de *Brassica rapa* con cantidades naturalmente altas de AA mostraron una mayor resistencia al virus del mosaico del nabo, mientras que las plantas *vtc1* son más susceptibles que las líneas de tipo salvaje (Fujiwara *et al.*, 2016). Además, Fujiwara *et al.*, 2013, informan un efecto antiviral del DHA aplicado a plantas de *Brassica rapa*. Además, en la bibliografía se han descrito los efectos del ácido L-ascórbico sobre el alargamiento de las raíces de las plantas en condiciones no infectadas (por ejemplo, Li *et al.*, 2018; Kka *et al.*, 2018).

En el documento WO 92/09202 se describe que se puede usar 2R,5R-dihidroximetil-3R,4R-dihidroxipirrolidina para controlar nematodos fitoparásitos mediante tratamiento foliar o del suelo.

El documento EP 2 875 730 muestra el uso de ácido deshidroascórbico, sus ésteres o sus glucósidos para proporcionar a las plantas resistencia al estrés.

Paciolla *et al.* (Plant Cell Phys. 2001, 42, 857-863) y Lee *et al.* (Plant Phys. Biochem. 2011, 49, 909-916) han demostrado una influencia negativa sobre el crecimiento de las raíces resultante del tratamiento de las plantas con ácido deshidroascórbico.

En la presente invención se demostró que la aplicación de ácido deshidroascórbico (DHA) mejora la tolerancia general de las plantas a la infección subterránea por nematodos parásitos. Además, se demostró que la aplicación de DHA tiene un efecto positivo sobre el alargamiento de las raíces de las plantas infectadas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de ácido deshidroascórbico (DHA), o un estereoisómero, tautómero, hidrato, sal, éster, solvato, complejo y/o análogo funcional del mismo, para controlar infecciones por nematodos en plantas y/o para promover el crecimiento de raíces en plantas infectadas (con nematodos). El uso de DHA ha demostrado ser eficaz contra los nematodos parásitos de las raíces, en particular los nematodos agalladores y/o los nematodos de los quistes. La aplicación de DHA exógeno o del compuesto proporcionado aquí puede realizarse en las hojas de la planta, como recubrimiento de semillas o como empapamiento del suelo. En una realización, la presente invención abarca una formulación de pulverización que comprende DHA o un compuesto de la invención.

Una ventaja particular es que se puede aplicar a la planta un compuesto de Fórmula I o II, más específico DHA, como medida preventiva o como agente de prehidratación parcial controlada, es decir, antes de la infección o de daños/signos visibles de infección. En una realización particular, la invención proporciona el uso de DHA, o un estereoisómero, tautómero, hidrato, sal, éster, solvato, complejo y/o análogo funcional del mismo, para estimular la defensa inmune de una planta contra la infección por nematodos, en particular contra nematodos parásitos de las raíces.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Efecto del DHA sobre el desarrollo radicular de plántulas de arroz. Se empaparon plántulas de arroz de 3 días con 1 ml de AA (20 mM), AO (20 U/ml), DHA (20 mM), o agua (H₂O) como control negativo. La longitud de la raíz del arroz (A), el peso seco de la raíz (B) y el número de raíces de la corona embrionarias (ECR; C) se midieron 5 días después del empapamiento. Las barras representan medias y desviación estándar de 8 plantas individuales para cada grupo de tratamiento. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con las plantas de control tratadas con agua (prueba de la t de Student $\alpha = 0,05$).

Figura 2. Efecto del DHA sobre el crecimiento de las raíces del arroz en condiciones no infectadas e infectadas con nematodos. Se pulverizaron foliarmente plantas de arroz de 14 días con AA (20 mM), AO (20 U/ml), DHA (20 mM), o agua (H₂O) como control negativo (Ctrl). Un día después, la mitad de las plantas se inocularon con 250 nematodos por planta. (A) La evaluación de la longitud de la raíz se realizó a los 4, 8 y 12 días después de la pulverización (DDP), que corresponde a 3, 7 y 11 días después de la inoculación (ddi) en el caso de plantas infectadas por nematodos. Cada punto muestra la media y el error estándar de 8 plantas individuales para cada grupo de tratamiento. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (prueba de la t de Student $\alpha = 0,05$) en comparación con el control de agua en el mismo momento.

Figura 3. Efecto de la aplicación foliar del DHA sobre la defensa de la raíz del arroz contra el nematodo agallador *M. graminicola*. Ensayo de susceptibilidad en plantas de arroz pulverizadas foliarmente con AA (20 mM), AO (20 U/ml), DHA (20 mM), o agua como control negativo (Ctrl). Se inocularon plantas de quince días con 250-300 nematodos. 24 horas antes de la inoculación, las plantas se pulverizaron con las respectivas sustancias químicas. El número de agallas por planta (A) y el número de nematodos por planta (B) se

contabilizaron a los 12 ddi. Las barras representan medias y errores estándar de 8 plantas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Duncan; $\alpha = 0,05$). Los datos representan uno de tres experimentos independientes con resultados similares. AO, ascorbato oxidasa; DHA, deshidroascorbato; AA, ácido ascórbico. Niveles reducidos de ácido ascórbico y DHA en los brotes (C) y en las raíces (D) de plantas pulverizadas foliarmente con AA, AO o DHA. Se pulverizaron plantas de dos semanas con sustancias químicas, y se recogieron muestras 24 h después. Se usó un total de 4 réplicas biológicas y tres réplicas técnicas por muestra. Las barras representan valores medios $\pm$ error estándar ($n = 4$). Se realizó una comparación múltiple post hoc con Duncan ($\alpha = 0,05$). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. AA, ácido ascórbico; AO, ascorbato oxidasa; DHA, ácido deshidroascórbico.

Figura 4. Efecto del tratamiento del suelo con DHA sobre la defensa de las raíces del arroz contra el nematodo agallador *Meloidogyne graminicola*.

Ensayo de susceptibilidad en suelo de plantas de arroz empapado con AA (20 mM), AO (20 U/ml), DHA (20 mM), o agua como control negativo. Se inocularon plantas de quince días con 250-300 nematodos. 24 horas antes de la inoculación, las plantas se empaparon en el suelo con las respectivas sustancias químicas. El número de agallas por planta (A) y el número de nematodos por planta (B) se contabilizaron a los 12 días después de la inoculación. Las barras representan medias y desviación estándar de 8 plantas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Duncan; $\alpha = 0,05$). Los datos representan uno de tres experimentos independientes con resultados similares. AO, ascorbato oxidasa; DHA, deshidroascorbato; AA, ácido ascórbico.

Figura 5. La defensa inducida por la oxidación de ascorbato contra los nematodos agalladores depende de la biosíntesis de JA y ET.

Nipponbare (Nip) de tipo salvaje y el mutante de señalización de JA *jar1* se pulverizaron con agua, AO (20 U/ml), DHA (20 mM) y DIECA (inhibidor de la biosíntesis de JA, 100 μ M) o AoA (inhibidor de la biosíntesis de ET, 12,5 mM), solo o en combinación con AO (20 U/ml) o DHA (20 mM). Las raíces de las plantas se inocularon con 300 juveniles de *M. graminicola* 24 horas después de la pulverización con las respectivas sustancias químicas. Las barras representan medias $\pm$ error estándar del número de agallas de 8 plantas a los 12 días después de la inoculación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (prueba de rangos múltiples de Duncan con $\alpha = 0,05$). MeJA, jasmonato de metilo; AO, ascorbato oxidasa; DHA, deshidroascorbato; AoA, ácido aminooxiacético; DIECA, ácido dietilditiocarbámico.

Figura 6. Efecto del DHA sobre el crecimiento de raíces y brotes en plantas de remolacha azucarera.

La evaluación de la longitud de la raíz de la remolacha azucarera (A), la altura de los brotes (B) y el peso fresco de la raíz (C) se realizó en plantas de remolacha azucarera pulverizadas foliarmente con AA (20 mM), AO (20 U/ml), DHA (20 mM), o agua (H_2O) como control negativo (Ctrl). La pulverización se realizó en plantas de 2 semanas, y las medidas se realizaron 1 semana después. Las barras representan medias y desviación estándar de 8 plantas individuales para cada grupo de tratamiento. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (prueba de la T de Student; $\alpha = 0,05$) en comparación con el control de agua.

Figura 7. Efecto del DHA sobre el crecimiento de raíces y brotes en remolacha azucarera en condiciones de infección por nematodos del quiste en un momento temprano.

Se pulverizaron foliarmente plantas de remolacha azucarera de 21 días con AA (20 mM), AO (20 U/ml), DHA (20 mM), o agua (H_2O) como control negativo. Un día después, las plantas se inocularon con 250 nematodos *Heterodera schachtii* por planta. La evaluación de la longitud de la raíz (A), el peso fresco de la raíz (B), la altura de los brotes (C) y el peso fresco de los brotes (D) se realizó a los 4 días después de la pulverización (DDP), que corresponde a 3 días después de la inoculación (ddi). Cada barra muestra la media y la desviación estándar de 8 plantas individuales para cada grupo de tratamiento. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (prueba de la T de Student; $\alpha = 0,05$) en comparación con el control de agua. AO, ascorbato oxidasa; DHA, deshidroascorbato; AA, ácido ascórbico.

Figura 8. Efecto del DHA sobre el peso fresco de las raíces (A) y el número de quistes (B) en la remolacha azucarera en condiciones de infección por nematodos del quiste en un momento posterior.

Se pulverizaron foliarmente plantas de remolacha azucarera de 21 días con AA (20 mM), AO (20 U/ml), DHA (20 mM), o agua como control negativo (Ctrl). Un día después, las plantas se inocularon con 250 nematodos *Heterodera schachtii* por planta. La evaluación se realizó a los 43 días después de la pulverización (DDP), que corresponde a 42 días después de la inoculación (ddi). Cada barra muestra la media y la desviación estándar de 8 plantas individuales para cada grupo de tratamiento. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (prueba de la T de Student; $\alpha = 0,05$) en comparación con el control de agua. AO, ascorbato oxidasa; DHA, deshidroascorbato; AA, ácido ascórbico.

Figura 9: Actividad de fenilalanina amoniaco liasa (PAL) en (A) brotes y (B) agallas y puntas de raíces no infectadas de plantas tratadas con DHA 20 mM o de forma simulada (Ctrl) 3 días después de la inoculación.

Las plantas no se infectaron (Mg-) o se inocularon con nematodos (Mg+). Se pulverizaron

plantas de arroz de 14 días, y 1 día después, las plantas se inocularon con nematodos *Meloidogyne graminicola* o se inocularon de forma simulada. Tres días después de la inoculación, se recogieron muestras para la medida. Las barras de error indican la desviación estándar de 4 réplicas biológicas que contienen un conjunto de 4 plantas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Duncan; $\alpha = 0,05$).
DHA, deshidroascorbato

Figura 10: Actividad de fenilalanina amoniaco liasa (PAL) en (A) brotes y (B) agallas y puntas de raíces no infectadas de plantas tratadas con DHA 20 mM o de forma simulada (Ctrl) 7 días después de la inoculación. Las plantas no se infectaron (Mg-) o se inocularon con nematodos (Mg+). Se pulverizaron plantas de arroz de 14 días, y 1 día después, las plantas se inocularon con nematodos *Meloidogyne graminicola* o se inocularon de forma simulada. Siete días después de la inoculación, se recogieron muestras para la medida. Las barras de error indican la desviación estándar de 4 réplicas biológicas que contienen un conjunto de 4 plantas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Duncan; $\alpha = 0,05$).
DHA, deshidroascorbato

Figura 11. Niveles de H₂O₂ en las raíces de plantas tratadas con DHA 20 mM frente a plantas de control tratadas con agua (Ctrl), medidos 1 día después de la inoculación de Mg (Mg+) o de la inoculación simulada (Mg-). Se pulverizaron plantas de arroz de 14 días, y 1 día después, las plantas se inocularon con nematodos *Meloidogyne graminicola* o se inocularon de forma simulada. Un día después de la inoculación, se recogieron raíces para la medida. Las medidas se realizaron usando el método de naranja de xilenol. Las barras de error indican la desviación estándar de 3 réplicas biológicas que contienen un conjunto de 4 plantas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Duncan; $\alpha = 0,05$).
DHA, deshidroascorbato

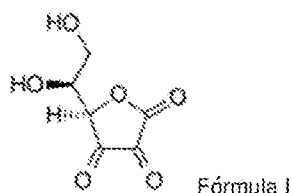
Figura 12. Esquema para examinar la expresión génica sistémica mediante secuenciación de ARN en plantas tratadas con DHA. DHA, deshidroascorbato

Descripción de la invención

Como se usan aquí, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes tanto en singular como en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Las expresiones "que comprende", "comprende" y "compuesto por", como se usan aquí, son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas del método adicionales no citados. La expresión "alrededor de", como se usa aquí cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o menos, preferiblemente $\pm 10\%$ o menos, más preferiblemente $\pm 5\%$ o menos, de y a partir del valor especificado, en la medida en que tales variaciones sean apropiadas para realizarse en la invención descrita. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "alrededor de" también se describe específica y preferiblemente. Mientras que las expresiones "uno o más" o "al menos uno", tal como uno o más o al menos un miembros de un grupo de miembros, son claras per se, mediante ejemplificación adicional, la expresión abarca, entre otras, una referencia a uno cualquiera de dichos miembros, o a dos o más de dichos miembros, tales como, por ejemplo, cualquiera >3 , >4 , >5 , >6 o >7 , etc. de dichos miembros, y hasta todos dichos miembros. Todas las referencias y enseñanzas a las que se hace referencia específicamente, citadas en la presente memoria descriptiva, se incorporan por la presente como referencia en su totalidad. A menos que se defina lo contrario, todos los términos usados en la descripción de la invención, incluidos los términos técnicos y científicos, tienen el significado comúnmente entendido por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. A modo de orientación adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor las enseñanzas de la presente invención. En los siguientes pasajes se definen con más detalle diferentes aspectos de la invención. Cada uno de los aspectos así definidos puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos, a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas. La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a "una realización" o "una realización" significa que un rasgo, estructura o característica particular descrita en relación con la realización está incluida en al menos una realización de la presente invención.

La presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula II para proteger plantas contra la infección con nematodos como se define en la reivindicación 1. Más específicamente, la presente memoria descriptiva describe la reducción o prevención del daño a las raíces por o debido a infecciones por nematodos en plantas, lográndose tal efecto aplicando ácido deshidroascórbico (DHA), o un estereoisómero, tautómero, hidrato, sal, éster, solvato, y /o complejo del mismo, a dicha planta. Además, se demostró que la aplicación de DHA tanto a plantas sanas como a plantas infectadas (por nematodos) da como resultado un mayor crecimiento de las raíces (por ejemplo, más raíces y más largas en comparación con las plantas de control). Además, se demostró que el aumento o la acumulación de DHA dentro de las raíces de las plantas da como resultado tolerancia contra la infección por nematodos, y promueve el crecimiento de las raíces. Por lo tanto, la memoria descriptiva describe un método para controlar infecciones por nematodos en una planta y/o para estimular el desarrollo de las raíces en una planta mediante la aplicación de un compuesto como se define en las reivindicaciones 1 o 13, en particular ácido deshidroascórbico (DHA), a la planta, induciendo de ese modo la acumulación de DHA en las raíces de dicha planta.

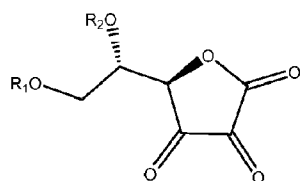
El ácido deshidroascórbico (DHA) ($C_6H_6O_5$; IUPAC (5R)-5-[(1S)-1,2-dihidroxiethyl]furan-2,3,4(5H)-triona) es una forma oxidada de ácido ascórbico (vitamina C), que tiene la siguiente fórmula estructural:



Fórmula I

La presente invención proporciona usos de DHA como se presenta en la Fórmula I, o un estereoisómero, tautómero, hidrato, éster, solvato, y/o complejo del mismo.

Por consiguiente, la presente invención proporciona usos de un compuesto de la Fórmula II, o un estereoisómero, tautómero, hidrato, sal, éster, solvato, y/o complejo del mismo, en los que el compuesto de Fórmula II es:



en la que R1 y R2 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, $-SO_3H$, $-PO_3H_2$, un grupo glicosilo,

o $-COX$, en el que X representa un grupo alquilo de C1 a C30 no sustituido o sustituido o un grupo alquenilo de C2 a C30 no sustituido o sustituido. En una realización, R2 representa xilosa. Más específicamente, al menos uno de R1 y R2 representa $-COX$, en el que X representa un grupo alquilo de C1 a C30 no sustituido o sustituido o un grupo alquenilo de C2 a C30 no sustituido o sustituido. El grupo glicosilo es un resto de azúcar tal como un monosacárido, por ejemplo glucosa, galactosa, fructosa, ramnosa;

o un oligosacárido de bajo peso molecular, por ejemplo rutinosa, vicianosa, lactosa, maltosa, sacarosa.

El número de sustituyentes en los grupos alquilo o alquenilo puede ser 1, o puede ser 2 o más. Dos o más sustituyentes pueden ser iguales, o pueden ser diferentes. Ejemplos de grupos que pueden ser un "sustituyente" en el grupo alquilo de C1 a C30 o en el grupo alquenilo de C2 a C30 incluyen un grupo hidroxilo; un grupo mercapto; un grupo amino; un grupo nitro; un átomo de halógeno; un grupo alcoxi; un grupo arilo; un grupo haloalcoxi; un grupo alquiltio; un grupo alquilamino; un grupo arilamino; un grupo ciano.

Un "grupo alquilo de C1 a C30" en X es un grupo hidrocarbonado saturado que comprende 1 a 30 átomos de carbono. Un grupo alquilo de C1 a C30 puede ser una cadena lineal o puede ser una cadena ramificada. Los ejemplos incluyen metilo, etilo, n-propilo, etc. Un "grupo alquenilo de C2 a C30" en X es un grupo hidrocarbonado insaturado que comprende 2 a 30 átomos de carbono que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Un grupo alquenilo de C2 a C30 puede ser una cadena lineal o puede ser una cadena ramificada. Los ejemplos incluyen propenilo, alilo, butenilo, pentenilo, etc.

Las sales agroquímicamente aceptables adecuadas pueden incluir sales de metales alcalinos, por ejemplo sales de sodio o potasio; sales de metales alcalino-térreos, por ejemplo sales de calcio o magnesio; y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados, por ejemplo sales de amonio cuaternario. Una sal puede ser cualquier compuesto iónico que pueda formarse mediante la reacción de neutralización de un compuesto ácido y una base. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una sal de amonio, de potasio o de isopropilamina. En otra realización, las sales de bases se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas, incluidas sales de aluminio, arginina, benzatrina, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, meglumina, olamina, trometamina y zinc. En una realización, también se pueden formar hemisales de ácidos y bases, por ejemplo sales de hemisulfato y hemicálcico. En una realización particular, la invención también abarca ésteres derivados de los compuestos de la invención. Dichos ésteres pueden ser de particular interés para una aplicación foliar en vista de sus propiedades de penetración mejoradas.

En una realización, la invención proporciona el uso de ácido L-deshidroascórbico (Número CAS 490-83-5).

En una realización adicional, el compuesto de Fórmula I o II, en particular DHA, se usa para controlar infecciones por nematodos en plantas. Más específicamente, el compuesto de la invención se usa para mejorar la tolerancia de plantas o cultivos a nematodos, en particular nematodos de raíces. La presente invención demuestra que la aplicación exógena del compuesto, en particular DHA, a una planta protege a las plantas contra la infección con nematodos, y

de manera más específica, inhibe la penetración de nematodos fitoparásitos (lo que da como resultado una reducción del número de nematodos en las plantas), mejora el crecimiento y desarrollo de las raíces en condiciones infectadas, y/o reduce el número de sitios de alimentación tales como, por ejemplo, la producción de agallas o sincitios por tales nematodos. Por lo tanto, los compuestos de la invención se pueden usar como un "estimulador de plantas", es decir, un compuesto que aumenta la defensa inmune de una planta y estimula el crecimiento de las raíces.

Las expresiones "controlar nematodos" o "proteger contra la infección por nematodos" se refieren a reducir el efecto negativo general de los nematodos fitopatógenos en las plantas, de manera que las plantas experimenten una menor cantidad de efectos negativos por dichos nematodos en comparación con las plantas no tratadas con el compuesto, en particular DHA. El efecto negativo general de los nematodos fitopatógenos se puede reducir, tal como reduciendo el número o la densidad total de nematodos fitoparásitos (es decir, disminución de la población de nematodos) en la planta, o reduciendo la gravedad o el alcance de los efectos negativos de los nematodos (por ejemplo, número de lesiones, manchas, marchitez, formación de agallas, putrefacción, muerte de las plántulas, reducción del crecimiento, pérdidas de rendimiento, etc.). Es particularmente ventajoso que el compuesto, en particular DHA, estimula la defensa inmune sistémica de la planta, y puede usarse de forma preventiva o preventiva como agente de prehidratación parcial controlada (por ejemplo, para plántulas o plantas no infectadas), así como curativa y sólo requiere una formulación simple. El uso como agente de prehidratación parcial controlada retrasará, o incluso evitará, el daño a la planta cuando se infecte.

Como se usa aquí, el término "nematodo" se refiere a animales multicelulares del filo Nematoda. "Nematodo fitoparásito" se refiere a parásitos nematodos de plantas que se pueden encontrar en/sobre raíces, semillas, flores, hojas, tallos, o el suelo en el que crece la planta. Los nematodos fitoparásitos se alimentan de todas las partes de la planta, incluidas raíces, tallos, hojas, flores y semillas, e incluyen microorganismos de los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Aphelenchoides*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Bursaphelenchus*, *Rotylenchulus*, *Nacobbus*, *Longidorus*, *Ditylenchus* y *Trichodorus*. En una realización, los nematodos parásitos son de los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera* y *Pratylenchus*.

Los "nematodos del quiste" (géneros *Heterodera* y *Globodera*) y los "nematodos agalladores" (género *Meloidogyne*), en particular, causan importantes pérdidas económicas en las plantas, especialmente en las plantas de cultivo. Ejemplos de nematodos del quiste incluyen *H. schachtii* (nematodo del quiste de la remolacha azucarera), *H. avenae* (nematodo del quiste de los cereales), *H. glycines* (nematodo del quiste de la soja), *H. sacchari* (nematodo del quiste de la caña de azúcar), *H. carotae* (nematodo del quiste de la zanahoria), *G. pallida* (nematodo del quiste blanco de la patata) y *G. rostochiensis* (nematodo del quiste amarillo de la patata). Los nematodos agalladores incluyen, por ejemplo, *M. graminicola*, *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. artiellia*, *M. fallax*, *M. hapla*, *M. microtyla*, *M. partityla*, *M. panyuensis*, *M. naasi*, *M. exigua*, *M. enterolobii* y *M. paranaensis*. Estos patógenos establecen "sitios de alimentación" en la planta, provocando la transformación morfológica de las células vegetales en células gigantes o sincitios, que bloquean el flujo de nutrientes y productos de la fotosíntesis. Por lo tanto, la "infección" por nematodos se refiere a la invasión y alimentación de los tejidos de la planta hospedante. Otros nematodos que causan daños significativos incluyen los nematodos de "lesión de las raíces", tales como *Pratylenchus*, particularmente *P. penetrans*, que infecta el maíz, el arroz y las hortalizas, *P. brachyurus*, que infecta la piña, *P. zeae*, que infecta los cereales, la caña de azúcar y el café, *P. coffeae*, que infecta el café y el plátano, y *P. thornei*, que infecta el trigo.

En una realización adicional, la invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o II, más específicamente DHA, o un estereoisómero, tautómero, hidrato, sal, éster, solvato, y/o complejo del mismo, para controlar la infección de una planta con un nematodo agallador seleccionado del grupo que consiste en: *M. graminicola*, *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. artiellia*, *M. fallax*, *M. hapla*, *M. microtyla*, *M. partityla*, *M. panyuensis*, *M. naasi*, *M. exigua*, *M. enterolobii* y *M. paranaensis*, en particular *M. graminicola*.

En otra realización, la invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o II, más específicamente DHA, o un estereoisómero, tautómero, hidrato, sal, éster, solvato, y/o complejo del mismo, para controlar la infección de una planta con un nematodo del quiste seleccionado del grupo formado por *H. schachtii*, *H. avenae*, *H. glycines*, *H. sacchari*, *H. carotae*, *G. pallida* y *G. rostochiensis*, en particular *H. schachtii*.

La presente memoria descriptiva describe una composición o formulación que comprende el compuesto de fórmula II como se proporciona aquí y un diluyente, un aditivo, un (micro)nutriente vegetal, un estabilizador de emulsión, un tensioactivo, un amortiguador, un aceite de cultivo, un inhibidor de la deriva, y/o un sustrato (inerte), en particular agua y/o un tensioactivo. En particular, la composición es una pulverización foliar, un empapamiento de raíces o un recubrimiento de semillas. Además, el compuesto usado en la invención, o una composición que lo comprende, puede incluir o usarse además en combinación con uno o más fertilizantes, bioestimulantes, herbicidas, fungicidas, bactericidas, acaricidas, nematocidas y/o insecticidas. En particular, la composición es una composición agroquímica que comprende DHA como se proporciona aquí, y al menos un excipiente, en particular un excipiente agrícola y/u hortícolamente aceptable. La expresión "agrícola y/u hortícolamente aceptable" indica que la formulación no es tóxica y de otro modo es aceptable para su aplicación a una planta, ya sea que se aplique en interiores (por ejemplo, en un ambiente contenido) o en exteriores (por ejemplo, en un ambiente no contenido que esté expuesto a otras formas de vida vegetal, animal y humana).

Los compuestos de Fórmula I o II, o como se proporcionan aquí, pueden aislarse (por ejemplo, en forma sustancialmente purificada) o prepararse sintéticamente usando técnicas estándar, o pueden estar comercialmente disponibles. En particular, el compuesto no forma parte de un extracto natural elaborado extrayendo una parte de una materia prima, a menudo usando un disolvente tal como etanol o agua (por ejemplo, extractos acuosos o etanólicos de semillas o plantas; aceites). Más en particular, el compuesto, en particular DHA (por ejemplo, como parte de una composición), se emplea con una pureza de 90 % a 100 %, preferiblemente de 95 % a 100 % (según su espectro de RMN).

Ejemplos de excipientes adecuados son Tween® 20 (que comprende polioxietileno (20) y monolaurato de sorbitán (polisorbato 20)), etoxilato de aceite de ricino, éster metílico de colza, fosfatos de alquilo, fosfato de tributilo, fosfato de tripropilo, sales de ácido naftalenosulfónico, sulfonato orgánico/2-metilpentano-2,4-diol, alquilpoliglucósido, derivados de siloxanos, alquilsulfonatos, policarboxilatos, lignosulfonatos, triglicéridos alcoxilados, polímeros de aminas grasas, y dioctilsulfosuccinatos.

La composición o formulación normalmente contendrá cantidades eficaces de un compuesto como se describe aquí. Una "cantidad eficaz" significa que se usa en una cantidad que permite obtener el efecto deseado pero que no da lugar a ningún síntoma fitotóxico significativo en la planta tratada. En una realización, la concentración del compuesto (por ejemplo, DHA) administrado sobre o a la planta oscila de 0,5 a 1000 mM, de 1 a 500 mM, en particular de 1 a 200 mM, más en particular de alrededor de 5 a alrededor de 150 mM, incluso más en particular de alrededor de 10 a alrededor de 100 mM.

Se puede tratar cualquier planta/cultivo. El término "planta (o plantas)" es sinónimo del término "cultivo", que debe entenderse como una planta de importancia económica y/o una planta cultivada por el hombre. Los métodos, compuestos y composiciones de la presente invención se pueden aplicar a cualquier planta monocotiledónea o dicotiledónea, o a un árbol. En una realización, la planta tratada pertenece a la familia del amaranto (Amaranthaceae), por ejemplo la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) o las espinacas (*Spinacia oleracea*). En otra realización, la planta tratada es una planta monocotiledónea, en particular una hierba, más en particular una hierba cereal tal como arroz. El arroz es monocotiledónea, e incluye los géneros *Oryza*, *Zizania* y *Porteresia*.

Según el uso de la presente invención, un compuesto de la invención, o una composición que lo comprende, se aplica a una planta, directa o indirectamente. Puede tratarse o usarse cualquier parte apropiada de la planta, incluidos órganos de la planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, y células vegetales y progenie de las mismas. En una alternativa, el compuesto o una composición se puede aplicar al suelo o sustrato que rodea a la planta, aunque en contacto directo con las raíces. La aplicación del compuesto es previa a la siembra, en el momento de la siembra, o después de la siembra. En una realización, la puesta en contacto incluye la aplicación directa a una planta. Toda o parte de una planta, incluyendo, sin limitación, hojas, tallos, raíces, propágulos (por ejemplo, esquejes), frutas, semillas, etc., puede ponerse en contacto con el compuesto como se proporciona aquí. La puesta en contacto también puede llevarse a cabo indirectamente, mediante aplicación, por ejemplo, al suelo u otros sustratos vegetales, pero haciendo posible la absorción por parte de la planta.

Los métodos de aplicación preferidos son el tratamiento foliar (por ejemplo, mediante pulverización), el tratamiento de semillas (por ejemplo, mediante recubrimiento de semillas), o el tratamiento del suelo (por ejemplo, mediante empapamiento del suelo), y en particular el tratamiento foliar. Las partes de la planta a tratar pueden ser una semilla, un fruto, un cuerpo frutal, una hoja, un tallo, un brote, un pedúnculo, una flor, una raíz, un tubérculo o un rizoma, en particular hojas.

Los métodos de aplicación adecuados incluyen pulverización a alta o baja presión, inmersión, atomización, formación de espuma, nebulización, recubrimiento, y encostración. Los expertos en la técnica pueden imaginar otros procedimientos de aplicación adecuados. En una realización particular, el compuesto de la invención se aplica a las partes de la planta aéreas o al follaje de la planta mediante pulverización, por ejemplo mediante el uso de pulverizadores mecánicos. Los pulverizadores convierten en gotitas una formulación de la invención que se mezcla con un vehículo líquido, tal como agua o fertilizante. Las gotitas pueden ser de cualquier tamaño. También se pueden usar pulverizadores de brazo y pulverizadores de chorro de aire para aplicar formulaciones de la invención a cultivos preemergentes o post-emergentes. Los pulverizadores de chorro de aire inyectan formulaciones de la invención mezcladas con un vehículo líquido en una corriente de aire que se mueve rápidamente. Cuando las formulaciones de la invención están en forma sólida, de polvo o de gránulos, se pueden aplicar con equipos de aplicación de gránulos o de polvo.

En otra realización, las semillas de una planta se recubren con un compuesto como se proporciona aquí ("semillas recubiertas").

Se puede usar cualquier método apropiado de recubrimiento de semillas conocido por la persona experta.

En otro aspecto, el compuesto usado en la invención, o una composición que lo comprende, se puede aplicar al sustrato de la planta (por ejemplo, en hidroponía) o al suelo directamente, por ejemplo mediante riego por goteo o aplicación por empapamiento (empapamiento del suelo). Un empapamiento del suelo aplica el compuesto, tal como

DHA, opcionalmente mezclado con agua, al suelo alrededor de la base de una planta para que sus raíces puedan absorber el extracto.

- 5 Según el uso de la presente invención, el compuesto de fórmula II, o la composición que comprende tal compuesto, se puede aplicar una vez a una planta (parte)/cultivo, o se puede aplicar dos o más veces, una tras otra, con un intervalo entre cada dos aplicaciones como puede determinar la persona experta en la técnica.

Ejemplos

10 **Materiales y métodos**

Material vegetal y condiciones de crecimiento

- 15 Arroz - Semillas de arroz silvestre *Oryza sativa* cv. Nipponbare se obtuvieron del USDA (GSOR-100). Las semillas germinaron en papel de filtro húmedo durante 4-5 días a 30°C, y entonces las plántulas se transfirieron a sustrato SAP (arena mezclada con polímero absorbente AquaPerla®, DCM, Bélgica), y se cultivaron adicionalmente a 28°C, bajo un régimen de luz de (día/noche) 12/12. La disolución de Hoagland se administró como fuente de nutrientes 3 veces por semana.

- 20 *Remolacha azucarera* - semillas del cv. Amarok se germinaron en tejido húmedo durante 4-5 días a 25°C. Para experimentos más prolongados, las plántulas se trasplantaron a tubos de policloruro de vinilo (PVC) que contenían partículas finas de tierra. Todos los experimentos se realizaron en una sala de crecimiento de plantas a 25°C, con un régimen día/noche de 16/8 h. Las plantas se fertilizaron suministrando disolución de Hoagland como fuente de nutrientes 3 veces por semana.

- 25 **Extracción de nematodos, inoculación y análisis de susceptibilidad y tolerancia de las plantas**

Nematodo agallador Meloidogyne graminicola

- 30 *M. graminicola* aislado originalmente en Filipinas (Batangas) se cultivó en plantas de arroz susceptibles. Los juveniles de segunda etapa (J2) se extrajeron usando un método de extracción con tamiz/bandeja y la inoculación se realizó como se describe en Nahar *et al.*, (2011). Para los ensayos de susceptibilidad, se realizaron al menos dos experimentos independientes, incluyendo cada vez ocho plantas por tratamiento. Doce días después de la inoculación (ddi), las raíces se tiñeron con fucsina ácida (Nahar *et al.*, 2011) para contar las agallas y el número de nematodos en las raíces.

Nematodo del quiste de la remolacha (BCN), Heterodera schachtii

- 40 Los BNC del quiste se obtuvieron de Irán, y se mantuvieron en plantas de remolacha azucarera (cv. Amarok). Los quistes se obtuvieron de cultivos madre, lavando el suelo infectado y dejando que los quistes flotarán en agua. Los quistes completos con huevos se recogieron a mano y se dejaron secar antes de prepararlos para la eclosión. Para que eclosionaran los juveniles de segunda etapa (J2), los quistes se colocaron en 3 mM de ZnCl₃, y se transfirieron a una incubadora/agitadora a una temperatura de 25,5°C a 70 rpm durante 4 días (Kammerhofer *et al.*, 2015). Los J2 se resuspendieron en agua, y se contaron bajo un estereomicroscopio. Se inocularon alrededor de 250-300 nematodos J2 por planta. Un día antes y después de la inoculación, las plantas no recibieron nutrientes ni agua. Para investigar la tolerancia de la planta a la infección por BCN, se midieron la longitud de las raíces, la altura de los brotes, el peso fresco de las raíces y el número de quistes en diferentes momentos después de la pulverización y/o de la inoculación. Para todos los experimentos, se usaron 8 plantas individuales por tratamiento.

50 **Aplicaciones químicas**

- El ácido ascórbico reducido (AA, 20 mM), el ácido deshidroascórbico (DHA, 20 mM), la ascorbato oxidasa (AO, 20 U/ml), el jasmonato de metilo (MeJA, 100 µM), el ácido aminooxiacético (AoA, 12,5 mM), el ácido dietilditiocarbámico (DIECA, 100 µM) y el etefón (100 µM) se adquirieron de Sigma, y se disolvieron en agua (excepto MeJA, que se disolvió primero en una gota de ETOH) para alcanzar la concentración indicada.

Evaluación del crecimiento de plántulas

- 60 Se empaparon plántulas de arroz de 3 días con 1 ml de AA (20 mM), AO (20 U/ml), DHA (20 mM), o agua (H₂O) como control negativo. La longitud de las raíces del arroz y el peso seco de las raíces, así como el número de raíces de la corona embrionarias (ECR), se midieron 5 días después del empapamiento.

Aplicación foliar y empapamiento del suelo

- 65 Para la aplicación foliar, todas las sustancias químicas se disolvieron en agua, y se añadió 0,02 % (v/v) de Tween20 como tensioactivo antes de pulverizar sobre las partes aéreas de las plantas de arroz. Las plantas de control se

pulverizaron con agua destilada que contenía Tween20 al 0,02 %. Se pulverizaron ocho plantas por tratamiento hasta escurrimiento con 6,5 ml de disolución (24 h antes de la inoculación de los nematodos, en los casos en los que se usaron plantas infectadas). El sustrato se cubrió para evitar el contacto directo con las raíces y/o nematodos.

- 5 Para la aplicación al suelo, se empaparon 6,5 ml de cada disolución sobre el sustrato, 24 h antes de la inoculación de los nematodos.

Análisis bioquímicos

- 10 *Medidas de ascorbato* - se recogieron raíces de plantas de un conjunto de 5-6 plantas por tratamiento, y se trituraron en nitrógeno líquido. En cada ensayo se usaron 100 mg de material triturado por muestra, y se analizaron al menos 4 réplicas biológicas por tratamiento. Los AA reducidos y oxidados se midieron según el método descrito en Ueda *et al.*, 2013. La absorbancia se monitorizó usando un lector de microplacas (TECAN - Infinite200pro).
- 15 *Medidas de H₂O₂* - plantas de arroz de 14 días se pulverizaron foliarmente con DHA 20 mM, y 1 día después, las plantas se inocularon con nematodos *Meloidogyne graminicola* (Mg+) o se inocularon de forma simulada (Mg-). Un día después de la inoculación, se recogieron muestras. Las muestras de raíces se congelaron instantáneamente y se molieron en nitrógeno líquido. Por muestra, se usaron 100 mg de material para llevar a cabo el método de naranja de xilenol para la cuantificación de H₂O₂ descrito por Cheeseman (2006). Después de una extracción con ácido tricloroacético al 5 %, y una reacción de 30 minutos con el reactivo sulfato ferroso amónico/naranja de xilenol (FOX), la absorbancia se midió a 560 nm. La concentración se calculó comparándola con una curva patrón de concentraciones conocidas de H₂O₂. El ensayo se realizó con 3 réplicas biológicas, cada una de las cuales consistió en material combinado de 4 plantas.
- 20
- 25 *Medidas de la actividad de PAL* - plantas de arroz de 14 días se pulverizaron foliarmente con DHA 20 mM, y 1 día después, las plantas se inocularon con nematodos *Meloidogyne graminicola* (Mg+) o se inocularon de forma simulada (Mg-). Tres o siete días después de la inoculación, se recogieron muestras. Se recogieron tanto agallas como tejido sistémico (brotes). Las muestras se congelaron instantáneamente y se molieron en nitrógeno líquido. Por muestra, se usaron 100 mg de material para llevar a cabo la medida de la actividad de PAL según Camacho-Cristóbal *et al.* (2002).
- 30 PAL se evaluó midiendo la formación de ácido transcinámico a 290 nm. Las muestras se disolvieron en 800 µl de fosfato de sodio 50 mM como amortiguador de ensayo que contenía polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 2 % (p/v), EDTA 2 mM, mercaptoetanol 18 mM, y Triton X-100 al 0,1 % (v/v). El homogeneizado se centrifugó a 8000 rpm, 4°C durante 10 min. En diferentes tubos de 2 ml, se mezclaron 135 µl de amortiguador de reacción, 50 µl de L-fenilalanina 5 mM, y 20 µl de sobrenadante, y la absorbancia se midió a 290 nm antes de la incubación a 40°C durante 30 minutos.
- 35 Después, se añadieron 10 µl de ácido clorhídrico, y se realizó nuevamente la medida a la misma longitud de onda. El ensayo se realizó con 4 réplicas biológicas, cada una de las cuales consistió en material combinado de 4 plantas.

Perfiles de expresión génica mediante secuenciación de ARN en tejido de raíz tras aplicación foliar en arroz

- 40 Se pulverizaron foliarmente plantas de arroz de catorce días con DHA 20 mM como se describe anteriormente. 1 día después del tratamiento se tomaron muestras del material de raíces de 3 réplicas biológicas de plantas de control y 3 réplicas biológicas de plantas tratadas. Cada réplica biológica consiste en al menos 4 plantas individuales que se combinaron para minimizar la variabilidad biológica inherente. El ARN se extrajo utilizando el RNeasy Mini Kit de Qiagen. La calidad y concentración de las muestras se evaluaron usando NanoDrop 2000. Se usó aproximadamente un microgramo de ARN total para la construcción de la biblioteca 3' mRNA-Seq usando el kit QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD para Illumina (Lexogen). Para minimizar los efectos del carril, las muestras se multiplexaron usando los adaptadores de secuenciación de multiplexación proporcionados en el kit Multiplexing Sample Preparation Oligo (Illumina). La selección del tamaño de la biblioteca se realizó en un gel de agarosa al 2 % (Low Range Ultra Agarose, Biorad 161-3107). La biblioteca desnaturalizada se diluyó hasta una concentración final de 6 pM, y se cargó en una celda de flujo (Illumina). Después de la generación del grupo, la biblioteca multiplexada se secuenció en un Illumina NextSeq500 (75 ciclos, extremo único, alto rendimiento). El análisis de datos se realizó usando Microsoft Open R (versión 3.5.2). Los datos sin procesar se sometieron a un control de calidad mediante la función fastqc. Tras el control de calidad, las muestras se recortaron (usando Trimmomatic (*Manual de Trimmomatic: V0.32*), y nuevamente se comprobó su calidad. Los datos recortados se cartografiaron en el genoma anotado mediante el uso de la función STAR-mapper (Dobin, 2019). La tabla de conteo de los datos se generó usando la función de resumen de superposiciones en R. Los genes expresados diferencialmente se detectaron usando la función DESEQ2, para analizar la tabla de conteo, y aplicando una tasa de descubrimiento falso de 0,01 (valores de p ajustados <0,01). Las listas de genes se analizaron usando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon en MapMan, para identificar rutas significativamente inducidas.
- 50
- 55
- 60

Resultados

Ejemplo 1: El DHA promueve el crecimiento de las raíces y la formación de raíces de la corona embrionarias en plántulas de arroz

65

Tres días después de la germinación, las plántulas de arroz se empaparon con 1 ml de AA (ácido ascórbico reducido, 20 mM), DHA (20 mM), o ascorbato oxidasa (AO, 20 U/ml), o agua como control. 5 días después de esta aplicación, la longitud de la raíz (Fig. 1A), el peso seco de la raíz (Fig. 1B) y el número de raíces de la corona embrionarias (ECR; Fig. 1C) fueron significativamente mayores en las plántulas tratadas con DHA. Las plántulas tratadas con AA tenían raíces ligeramente más cortas (Fig. 1A) y significativamente menos ECR (Fig. 1C) que las plantas de control, y las plántulas generalmente parecían más vigorosas después del tratamiento con DHA. Si bien la AO también tuvo algunos efectos positivos sobre el peso seco de las raíces y la ECR, no se observaron efectos en la longitud de las raíces para este compuesto.

Ejemplo 2: El DHA mejora la tolerancia del arroz a la infección por nematodos agalladores

Se pulverizaron foliarmente plantas de arroz de 14 días con AA (20 mM), AO (20 U/ml), DHA (20 mM), o agua (H₂O) como control negativo (Ctrl). Un día después, la mitad de las plantas se inocularon con 250 nematodos por planta, mientras que la otra mitad permaneció sin infectar. La longitud de las raíces de todas las plantas se monitorizó en tres momentos diferentes: 4 días, 8 días y 12 días después de la pulverización (DDP). En condiciones no infectadas (Fig. 2A izquierda), sólo las plantas tratadas con DHA tenían raíces significativamente más largas a los 12 DDP. En condiciones infectadas por nematodos, las plantas tratadas con AO tuvieron un ligero aumento en la longitud de las raíces, mientras que las plantas tratadas con DHA tuvieron la mejora más significativa en la longitud de las raíces tanto a los 8 DDP (7 días después de la inoculación de nematodos) como a los 12 DDP (11 días después de la inoculación de nematodos) (Fig. 2B).

Ejemplo 3: La pulverización foliar con DHA protege al arroz contra la infección por nematodos agalladores

Las plantas de arroz se pulverizaron foliarmente con AA (20 mM), DHA (20 mM), o ascorbato oxidasa (AO, 20 U/ml), 24 h antes de la inoculación de los nematodos. Investigamos el efecto de estos tratamientos sobre el número de agallas y el número de nematodos a los 12 ddi. No hubo diferencias significativas en el número de agallas y el número total de nematodos entre las plantas de control y las rociadas con AA (Fig. 3A y B), pero sí se observó un número significativamente menor de agallas (Fig. 3A) y un menor número de nematodos (Fig. 3B) en plantas de arroz pulverizadas con AO o con DHA.

También evaluamos el efecto de la aplicación foliar de estas sustancias químicas (AA, AO y DHA) sobre los niveles endógenos de AA reducido y AA oxidado (=DHA), 24 h después de su aplicación. La cantidad de AA reducido aumentó significativamente en los brotes de las plantas pulverizadas con AA (Figura 3C), mientras que no se observaron cambios en las raíces (Fig. 3D). Tras la aplicación foliar de AO, los niveles totales de ascorbato reducido y oxidado disminuyeron ligeramente en los brotes, mientras que principalmente DHA se acumuló en las raíces de las plantas pulverizadas frente a las plantas de control (Fig. 3D). Los brotes pulverizados con DHA contenían cantidades significativamente mayores de DHA que las plantas de control, en los brotes, mientras que el nivel total de ascorbato aumenta en las raíces (Fig. 3C y 3D). Estos datos muestran que el DHA tiene un efecto sistémico en la planta. Los resultados obtenidos con aplicaciones foliares demuestran que el DHA, aplicado externamente, reduce la susceptibilidad de la raíz del arroz al RKN.

Ejemplo 4: Empapar el suelo con DHA protege el arroz contra la infección por nematodos agalladores

En este experimento se aplicaron los mismos tratamientos que en el ejemplo 3 como empapamiento del suelo. Doce días después de la inoculación del nematodo agallador (*M. graminicola*), no observamos diferencias significativas en el número de agallas y el número total de nematodos entre plantas de arroz de control y plantas de arroz empapadas en suelo con AO (Fig. 4A y B). Sin embargo, se observó un número significativamente menor de agallas (Figura 4A) y un menor número de nematodos (Figura 4B) en el suelo de las plantas de arroz empapado con AA o DHA. Estos datos muestran que la aplicación de DHA reduce el número de agallas y de nematodos en las plantas de arroz. En combinación con el ejemplo 3, estos resultados muestran que el DHA se puede aplicar tanto como empapamiento del suelo y como pulverización foliar para proteger sistémicamente a la planta de la infección por nematodos.

Ejemplo 5: El DHA activa la defensa sistémica de las raíces contra los nematodos a través de la ruta JA/ET

Para investigar si la inducción de una defensa sistémica inducida en el arroz contra los nematodos agalladores funciona mediante la activación de etileno (ET) y ácido jasmónico (JA), se llevó a cabo un experimento de infección usando la aplicación foliar de DHA. Este tratamiento se realizó en el mutante *Osjar1* de señalización de jasmonato y en plantas Nipponbare (Nip) de tipo salvaje. Además, DHA se pulverizó en Nipponbare de tipo salvaje en combinación con el inhibidor de la biosíntesis de JA, sal de amonio del ácido dietilditiocarbámico (DIECA), o el inhibidor de la biosíntesis de ET, ácido aminooxiacético (AoA) (Fig. 5B). Nuevamente, se observó una reducción significativa en el número de agallas (reducción del 50-70 %) en las plantas de tipo salvaje pulverizadas con DHA en comparación con las plantas de tipo salvaje no pulverizadas. Se observó un número significativamente mayor de agallas en las plantas mutantes *Osjar1* y pulverizadas con DIECA en comparación con Nipponbare de tipo salvaje, lo que confirma y amplía los resultados de Nahar *et al.* (2011), que muestran que JA está implicado en la defensa contra RKN en arroz. Sin embargo, sólo se observó una reducción del 25-30 % en los mutantes *Osjar1* pulverizados con DHA, y de manera similar, sólo se observó una reducción del 20 % en plantas pulverizadas con una combinación de DIECA y DHA. Las

plantas pulverizadas con inhibidor de ET, AoA, tuvieron un número significativamente mayor de agallas en comparación con las plantas de control. Sin embargo, cuando se combinó AoA con DHA, nuevamente sólo se observó una reducción del 20 % (Fig. 5B). En conjunto, se puede concluir que la defensa sistémica inducida por DHA contra los nematodos agalladores depende parcialmente de la activación de las rutas de JA y ET.

Ejemplo 6: El DHA mejora la longitud de las raíces de la remolacha azucarera y la salud general de las plantas jóvenes

Se pulverizaron foliarmente plantas de remolacha azucarera de dos semanas con AA (20 mM), AO (20 U/ml), DHA (20 mM), o agua como control negativo (Ctrl). Siete días más tarde, se midió la longitud de raíz y brote, y el peso fresco de la raíz. Los resultados, que se muestran en la figura 6, revelan que las plantas tratadas con AO y DHA tenían raíces significativamente más largas. Esto demuestra que la oxidación de ascorbato en las plantas, mediante el suministro de tratamiento con DHA o AO, mejora el crecimiento de las raíces. Aunque no fue estadísticamente significativo, ambos tratamientos también afectaron positivamente la longitud de los brotes y el peso de las raíces (Fig. 6B y 6C). En general, las plantas tratadas con DHA parecieron más vigorosas durante todo el experimento.

Ejemplo 7: La pulverización foliar con DHA protege a la remolacha azucarera contra la infección por nematodos del quiste de la remolacha

Se pulverizaron foliarmente plantas de remolacha azucarera de tres semanas con AA (20 mM), AO (20 U/ml), DHA (20 mM), o agua como control negativo (Ctrl). Un día después, las plantas se inocularon con 250 nematodos *Heterodera schachtii* por planta. 3 días después, que corresponde a 4 días después de la pulverización (DDP), se evaluaron los parámetros de raíces y brotes. Los resultados, que se muestran en la Figura 7, revelan un aumento significativo en la longitud de la raíz (Fig. 7A), el peso de la raíz (Fig. 7B) y el peso de los brotes (Fig. 7D) en las plantas tratadas con DHA. La altura de los brotes también se vio influida positivamente por este tratamiento, aunque no fue estadísticamente significativa (Fig. 7C). Ninguno de los otros tratamientos (AA o AO) tuvo efectos significativos sobre estos parámetros.

Las mismas plantas también se evaluaron en un momento posterior, concretamente 43 DDP, correspondiente a 42 días después de la inoculación de los nematodos. En este momento, las plantas tratadas con DHA todavía tenían significativamente más peso fresco de las raíces (Fig. 8A) y un sistema de raíces mejor desarrollado que las plantas de control, mientras que otros tratamientos no tuvieron ningún efecto significativo. El número de quistes encontrados en las plantas tratadas con DHA fue significativamente menor en comparación con las plantas no tratadas (Fig. 8B). Esto confirma que el DHA induce una defensa sistémica contra la infección por nematodos del quiste de la remolacha en las plantas de remolacha azucarera.

Ejemplo 8: Inducción de respuestas de defensa de las plantas ante la infección por nematodos en plantas tratadas con DHA

Se investigaron medidas bioquímicas de las respuestas de defensa, más específicamente los niveles de H₂O₂ y la actividad de PAL, en plantas tratadas con DHA 20 mM, que no estaban infectadas o estaban infectadas con el nematodo agallador *M. graminicola*. La actividad de PAL, que es una indicación de la activación de la ruta de los fenilpropanoides, aumenta fuertemente con el tratamiento con DHA tanto en tejidos infectados localmente -es decir, agallas en comparación con las puntas de las raíces no infectadas- como en tejidos sistémicos de brotes de plantas infectadas frente a no infectadas, a las 3 y 7 dpi (Figuras 9 y 10). H₂O₂, típicamente una de las primeras respuestas de defensa de las plantas, también se induce en plantas pretratadas con DHA tras la infección por nematodos a 1 ddi (Figura 11). Estos resultados indican que la respuesta de la planta para protegerse contra la infección por nematodos se potencia con el tratamiento con DHA.

Ejemplo 9: Inducción de rutas de defensa vegetal en raíces de plantas de arroz después de la aplicación foliar de DHA

Para confirmar la inducción de defensa por DHA, se realizó un análisis de expresión génica ("análisis de transcriptoma"; Figura 12) en raíces de plantas de arroz 1 día después de la pulverización foliar con DHA (20 mM) en comparación con plantas tratadas de forma simulada. Se encontró que múltiples rutas estaban significativamente activadas (valor de p corregido <0,01) en las raíces de las plantas tratadas con DHA, y las cinco rutas más fuertemente inducidas se muestran en la Tabla 1. El tratamiento con DHA induce la expresión de genes implicados en la ruta de los fenilpropanoides, responsable de la producción de múltiples compuestos implicados en la defensa de las plantas, tales como el ácido salicílico, la lignina y las antocianinas. Esta observación confirma las medidas de actividad de PAL (Figuras 9 y 10). Los genes implicados en la producción de jasmonato, etileno y factores de transcripción WRKY, todos ellos actores bien conocidos en la defensa de las plantas, también se inducen en las raíces tras el tratamiento foliar con DHA.

Tabla 1. El perfil de expresión génica sistémica mediante secuenciación de ARN en raíces de plantas tratadas con DHA 20 mM revela la inducción de procesos relacionados con la defensa de las plantas. Se muestran las 5 principales rutas inducidas significativamente y los valores de p ajustados por FDR. DHA: deshidroascorbato

Proceso/Función	Valor p ajustado
Metabolismo secundario.fenilpropanoides	6,57×10 ⁻⁶
Metabolismo secundario.fenilpropanoides.biosíntesis de lignina	5,03×10 ⁻⁵
Metabolismo del jasmonato	4,09×10 ⁻³
ARN.regulación de la transcripción.familia de factores de transcripción del dominio WRKY	4,23×10 ⁻³
Metabolismo del etileno	1,07×10 ⁻²

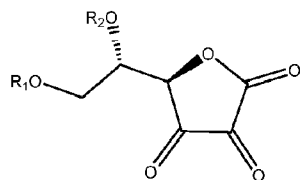
Referencias

- Camacho-Cristóbal, JJ, Anzellotti D., Gonzales-Fontes A. 2002. Changes In Phenolic Metabolism of Tobacco Plants During Short-Term Boron Deficienc. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 997-1002.
- Cheeseman J.M. 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany* 57, 2435-2444,
- Dhankher OP, Foyer CHJP. 2018. Climate resilient crops for improving global food security and safety. *Plant Cell & Environment* 41, 877-884.
- Fujiwara A, Shimura H, Masuta C, Sano S, Inukai TJJ. 2013. Exogenous ascorbic acid derivatives and dehydroascorbic acid are effective antiviral agents against Turnip mosaic virus in Brassica rapa. *Journal of General Plant Pathology* 79, 198-204.
- Fujiwara A, Togawa S, Hikawa T, Matsuura H, Masuta C, Inukai T. 2016. Ascorbic acid accumulates as a defense response to Turnip mosaic virus in resistant Brassica rapa cultivars. *Journal of experimental botany* 67, 4391-4402.
- Huang WK, Ji HL, Gheysen G, Kyndt T. 2016. Thiamine-induced priming against root-knot nematode infection in rice involves lignification and hydrogen peroxide generation. *Molecular plant pathology* 17, 614-624.
- Jisha K, Puthur JT. 2016. Seed priming with BABA (β -amino butyric acid): a cost-effective method of abiotic stress tolerance in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Protoplasma* 253, 277-289.
- Jones JD, Dangl LJN. 2006. The plant immune system. 444, 323.
- Kammerhofer N, Radakovic Z, Regis J, Dobrev P, Vankova R, Grundler FM, Siddique S, Hofmann J, Wiczorek K. 2015. Role of stress-related hormones in plant defence during early infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in Arabidopsis. *New Phytologist* 207, 778-789.
- Kim SY, Volsky DJ. 2005. PAGE: Parametric analysis of gene set enrichment. *Bmc Bioinformatics* 6. Kka N, Rookes J, Cahill D. 2018. The influence of ascorbic acid on root growth and the root apical meristem in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology and Biochemistry*. 129: 323-330.
- Kyndt T, Fernandez D, Gheysen G. 2014. Plant-parasitic nematode infections in rice: molecular and cellular insights. *Annual review of phytopathology* 52, 135-153.
- Li X, Makavitskaya M, Samokhina V, Mackievic V, Navaselsky I, Hryvusevich P, Smolikova G, Medvedev S, Shabala S, Yu M, Demidchik V. 2018 Effects of exogenously-applied L-ascorbic acid on root expansive growth and viability of the border-like cells, *Plant Signaling & Behavior*, 13:9.
- Moens M, Perry RN, Jones JT. 2018. Cyst nematodes-Life cycle and economic importance. *Capítulo de libro en: Cyst Nematodes*, CABI, Wallingford, UK, 1-26.
- Nahar K, Kyndt T, De Vleeschauwer D, Höfte M, Gheysen G. 2011. The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defence against root knot nematodes in rice. *Plant Physiology* 157, 305-316.

- Pavet V, Olmos E, Kiddle G, Mowla S, Kumar S, Antoniow J, Alvarez ME, Foyer CH. 2005. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139, 1291-1303.
- 5 Perry RN, Moens M, Jones JT. 2018. *Cyst Nematodes*: CABI. April 2018, 488 Páginas, 9781786390837
- Sobczak M, Golinowski W. 2009. Structure of cyst nematode feeding sites. *Cell biology of plant nematode parasitism*: Springer, 153-187.
- 10 Singh RR, Chinnasri B, De Smet L, Haeck A, Demeestere K, Van Cutsem P, Van Aubel G, Gheysen G, Kyndt T. 2019. Systemic defense activation by COS-OGA in rice against root-knot nematodes depends on stimulation of the phenylpropanoid pathway. *Plant physiology and biochemistry* 142, 202-210.
- 15 Ueda Y. et al. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 70, September 2013, Pages 418-423
- Wyss U, Grundler FMW. 1992. Feeding behavior of sedentary plant parasitic nematodes. *Neth. J. Pl. Pathology* 98, 65-173.
- 20 Zhan L-P, Peng D-L, Wang X-L, Kong L-A, Peng H, Liu S-M, Liu Y, Huang W-K. 2018. Priming effect of root-applied silicon on the enhancement of induced resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* in rice. *BMC Plant biology* 18, 50.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de la Fórmula II, o un estereoisómero, tautómero, hidrato, sal, éster, solvato, y/o complejo del mismo, en el que el compuesto de Fórmula II es:



en el que R1 y R2 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, -SO3H, -PO3H2, un grupo glicosilo, o -COX, en el que X representa un grupo alquilo de C1 a C30 no sustituido o sustituido, o un grupo alquenilo de C2 a C30 no sustituido o sustituido, para proteger plantas contra la infección por nematodos.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto es ácido deshidroascórbico (DHA), o un estereoisómero, tautómero, hidrato, éster o solvato del mismo.

3. Uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el nematodo es un nematodo parásito de las raíces, en particular un nematodo agallador y/o un nematodo del quiste.

4. Uso según la reivindicación 3, en el que el nematodo agallador se selecciona del grupo que consiste en: *Meloidogyne graminicola*, *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. artiellia*, *M. fallax*, *M. hapla*, *M. microtyla*, *M. partityla*, *M. panyuensis*, *M. naasi*, *M. exigua*, *M. enterolobii* y *M. paranaensis*; y/o en el que el nematodo del quiste se selecciona del grupo que consiste en *Heterodera schachtii*, *H. avenae*, *H. glycines*, *H. sacchari*, *H. carotae*, *Globodera pallida* y *G. rostochiensis*.

5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la planta es una monocotiledónea, en particular una gramínea, más en particular arroz.

6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la planta es una dicotiledónea, en particular una planta de la familia *Amaranthaceae*, más en particular remolacha azucarera.

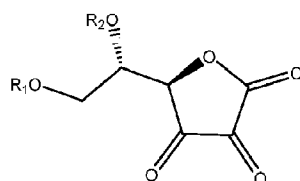
7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto se aplica a las hojas de la planta, como un recubrimiento de semillas o como un empapamiento del suelo.

8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto se aplica a las hojas de la planta mediante pulverización.

9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el compuesto se aplica a la planta como agente de prehidratación parcial controlada.

10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el compuesto está comprendido en una composición agroquímica que comprende además un excipiente agrícola y/u hortícola aceptable.

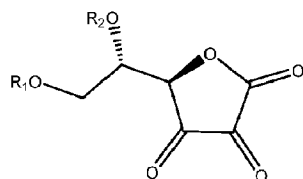
11. Uso de un compuesto de la Fórmula II, o un estereoisómero, tautómero, hidrato, sal, éster, solvato, y/o complejo del mismo, para estimular el crecimiento de raíces en plantas infectadas, en particular plantas infectadas por nematodos, en el que el compuesto de Fórmula II es:



en el que R1 y R2 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, -SO3H, -PO3H2, un grupo glicosilo, o -COX, en el que X representa un grupo alquilo de C1 a C30 no sustituido o sustituido, o un grupo alquenilo de C2 a C30 no sustituido o sustituido.

12. Uso según la reivindicación 11, en el que el compuesto es ácido deshidroascórbico (DHA), o un estereoisómero, tautómero, hidrato, éster, solvato, y/o complejo del mismo.

13. Uso de un compuesto de la Fórmula II, o un estereoisómero, tautómero, hidrato, sal, éster, solvato, y/o complejo del mismo, para estimular la defensa inmune de una planta contra la infección por nematodos, en particular contra nematodos parásitos de las raíces, en el que el compuesto de Fórmula II es:



5

en el que R1 y R2 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, -SO3H, -PO3H2, un grupo glicosilo, o -COX, en el que X representa un grupo alquilo de C1 a C30 no sustituido o sustituido, o un grupo alquenilo de C2 a C30 no sustituido o sustituido.

10

14. Uso según la reivindicación 13, en el que el compuesto es ácido deshidroascórbico (DHA), o un estereoisómero, tautómero, hidrato, éster, solvato, y/o complejo del mismo.

FIG. 1 A

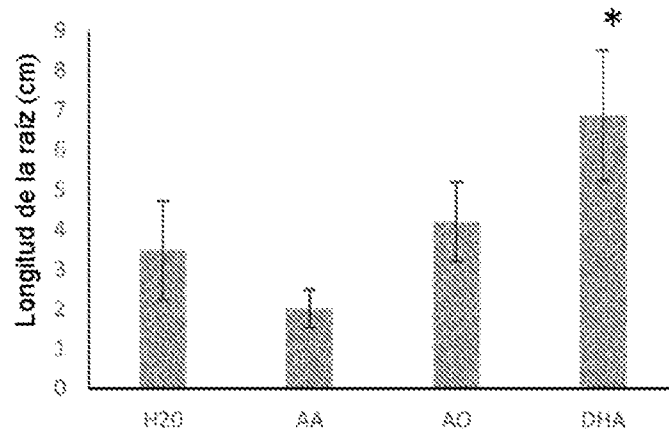


FIG. 1 B

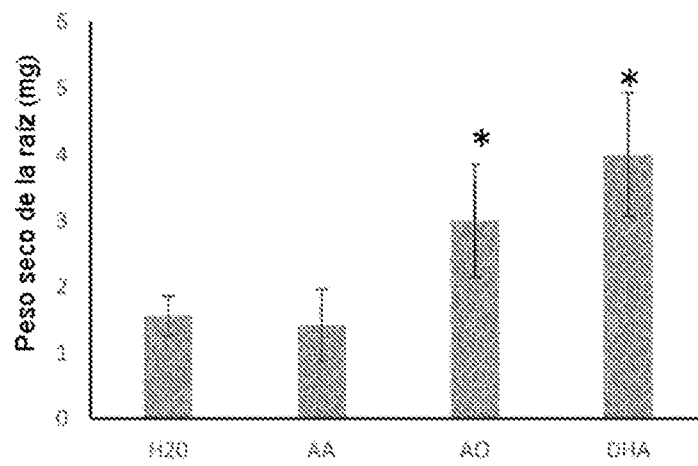


FIG. 1 C

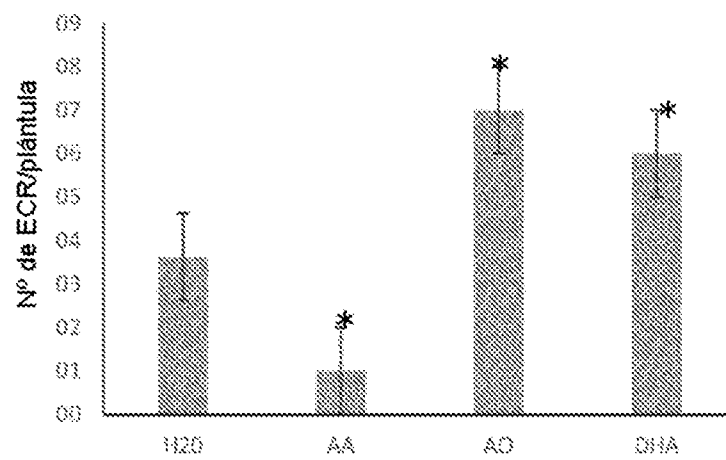


FIGURA 1

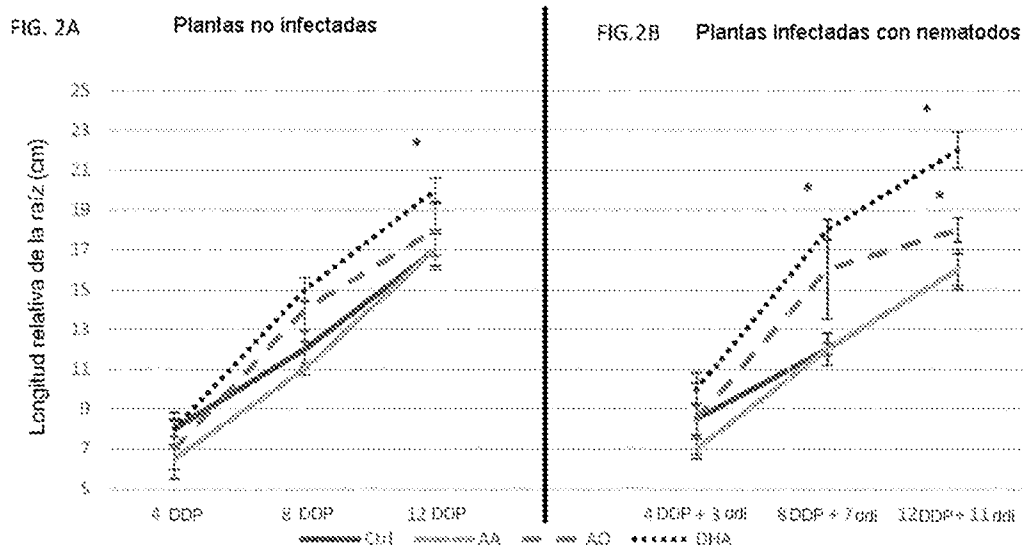


FIGURA 2

FIG. 3A

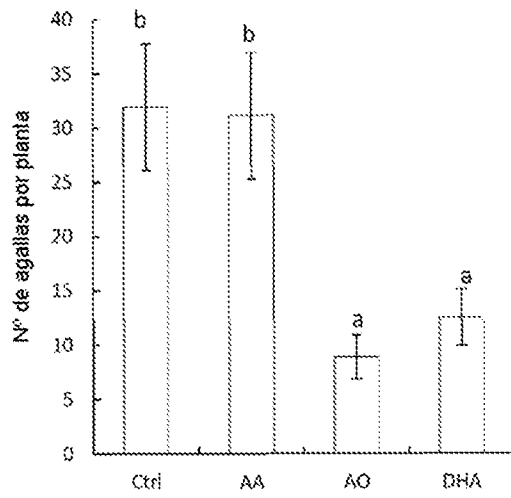


FIG. 3B

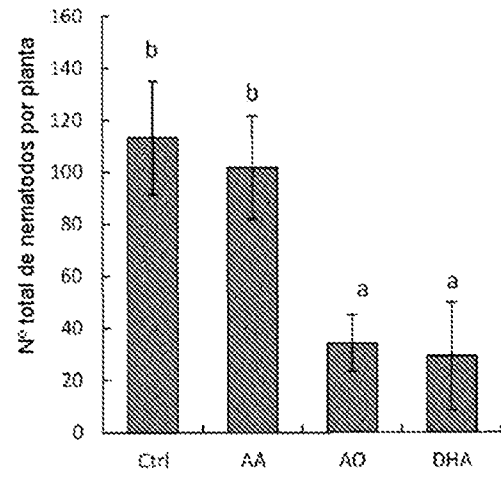


FIG. 3C

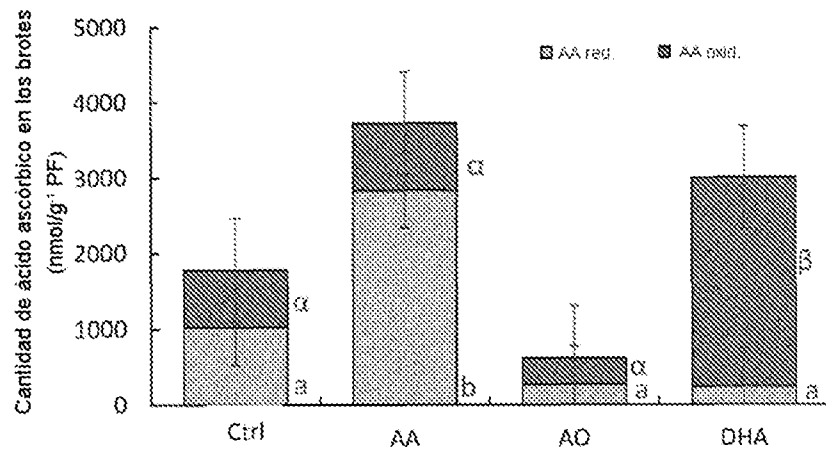


FIGURA 3

FIG. 3D

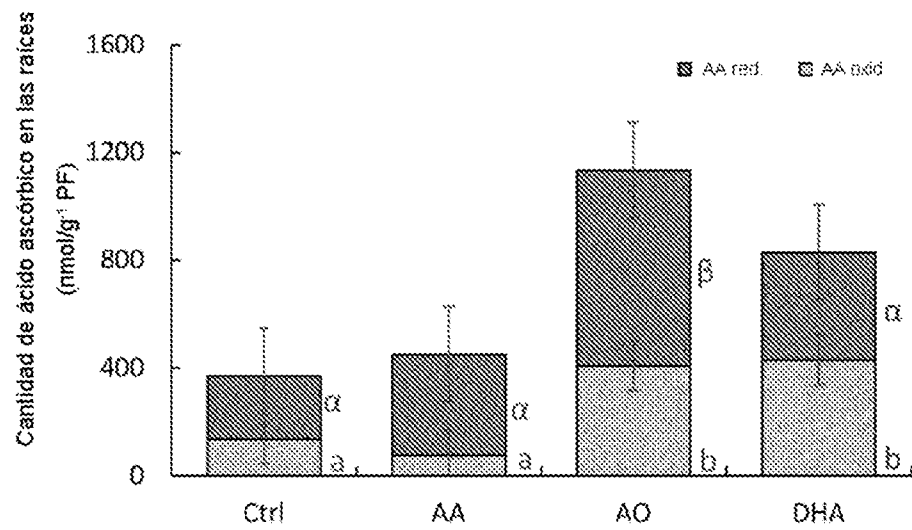


FIGURA 3 - continuación

FIG. 4A

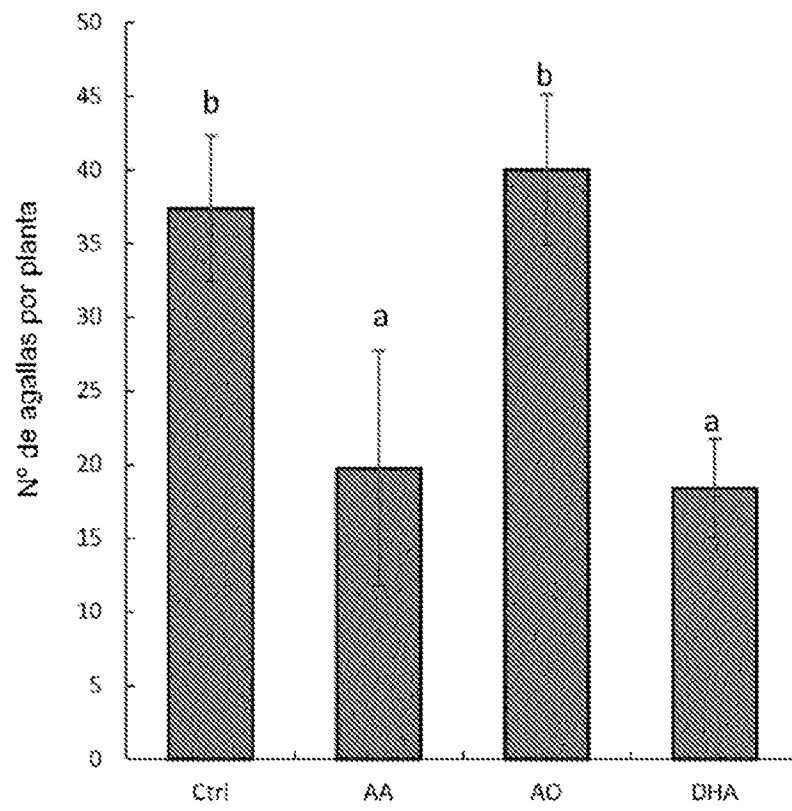


FIG. 4B

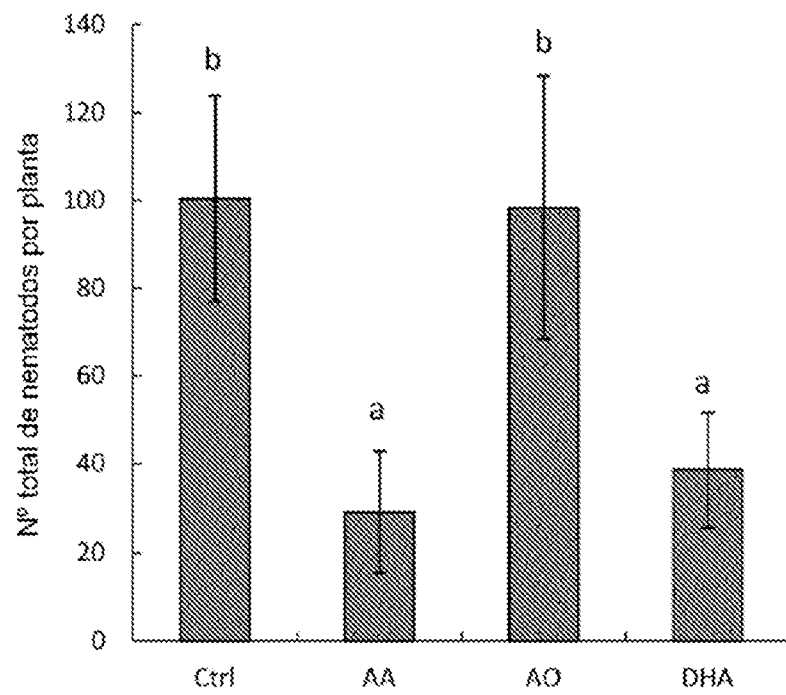


FIGURA 4

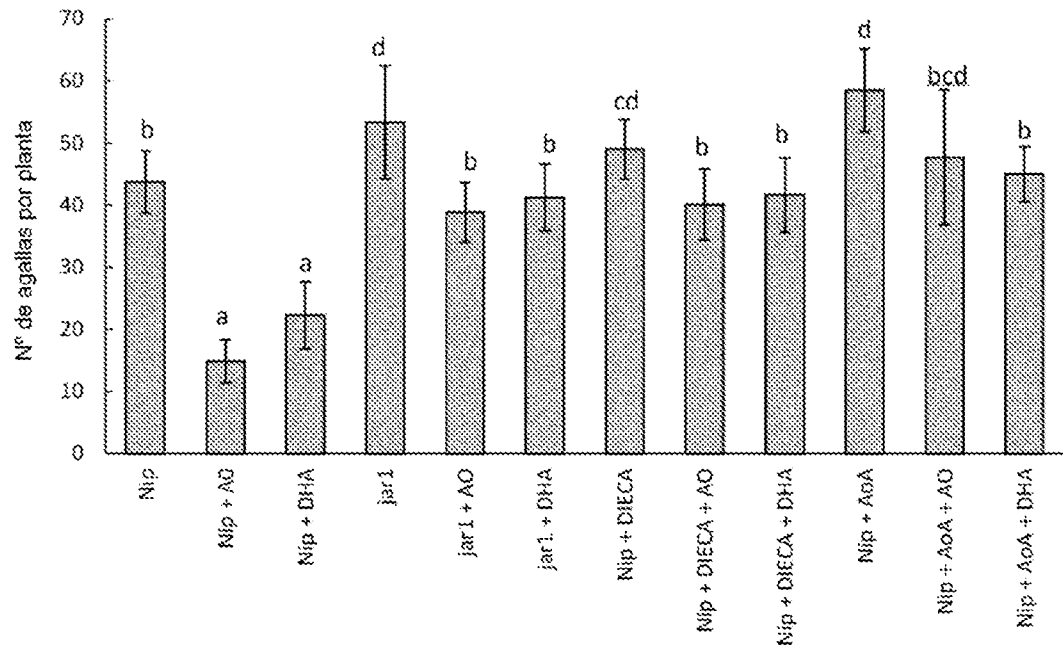


FIGURA 5

FIG. 6A

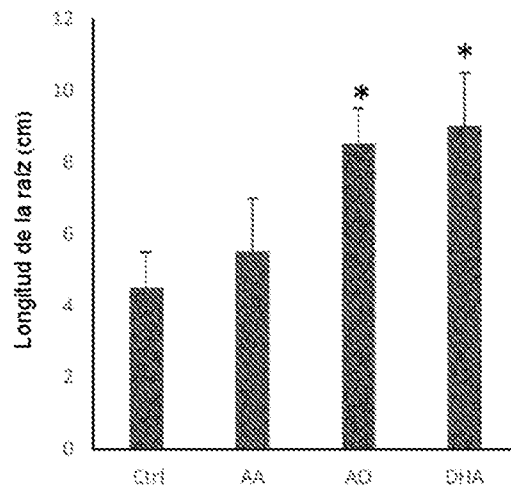


FIG. 6B

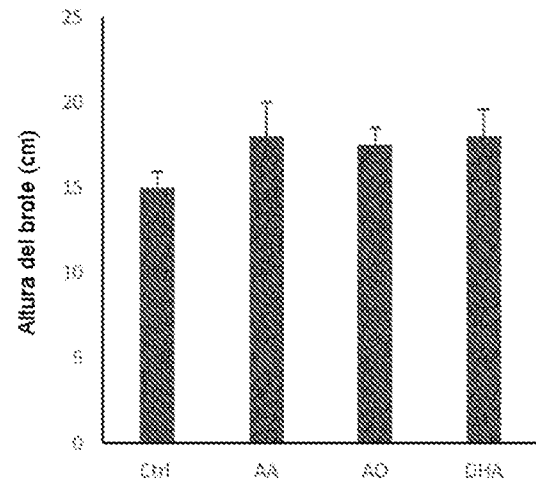


FIG. 6C

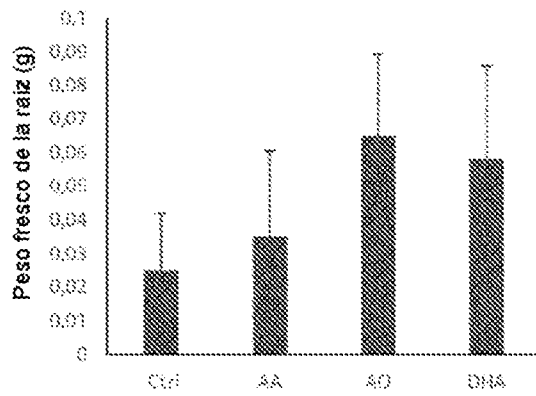


FIGURA 6

FIG. 7A

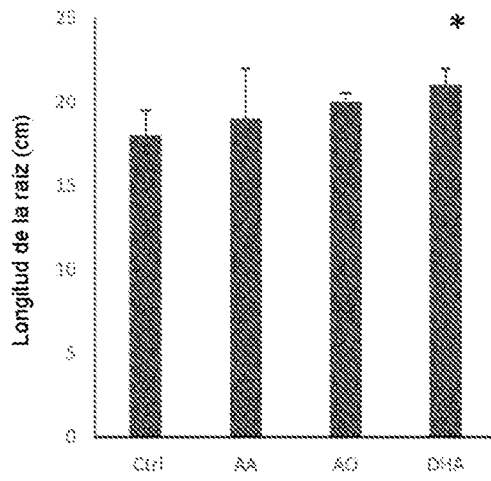


FIG. 7B

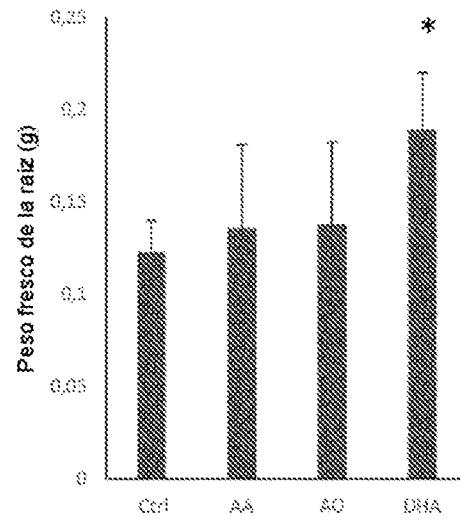


FIG. 7C

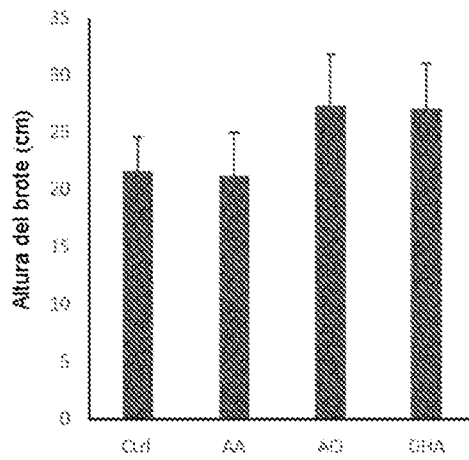


FIG. 7D

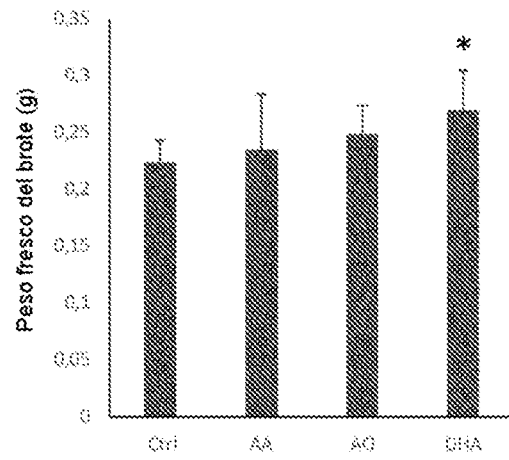


FIGURA 7

FIG. 8A

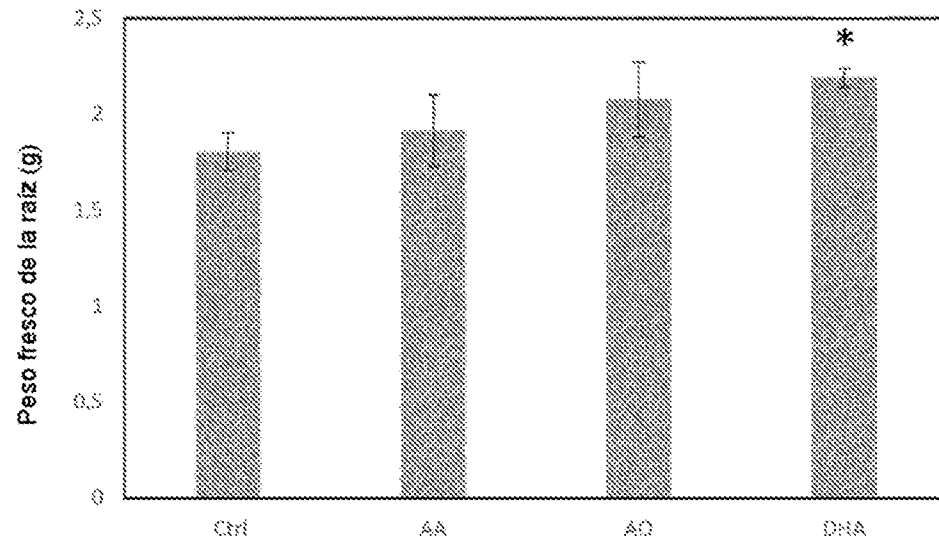


FIG. 8B

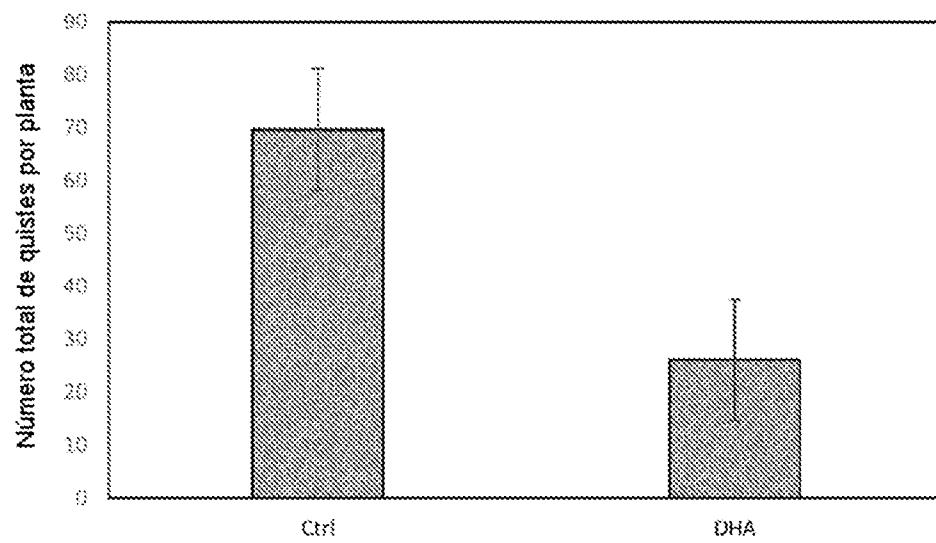


FIGURA 8

FIG. 9A

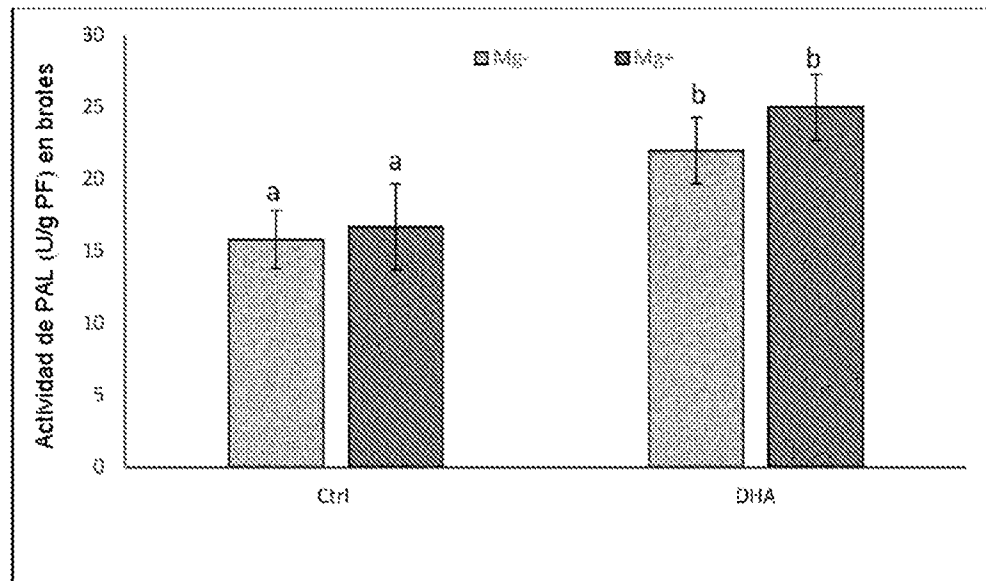


FIG. 9B

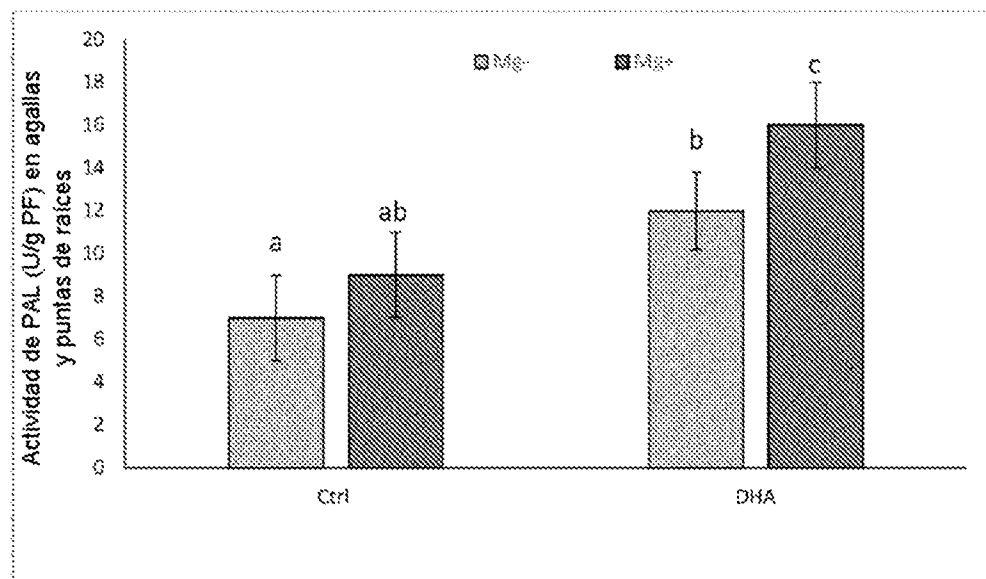


Figura 9

FIG. 10A

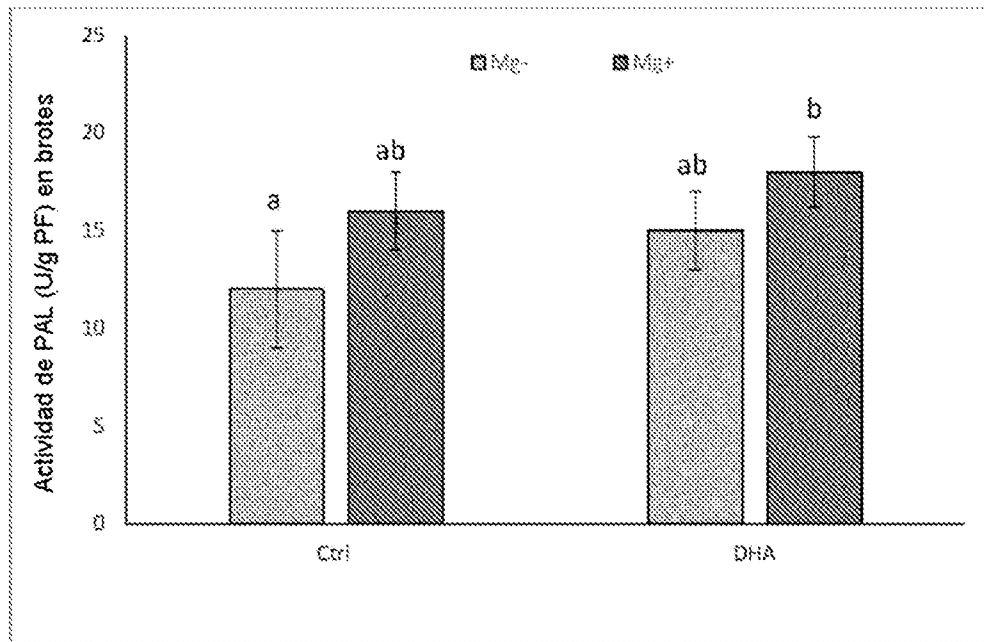


FIG. 10B

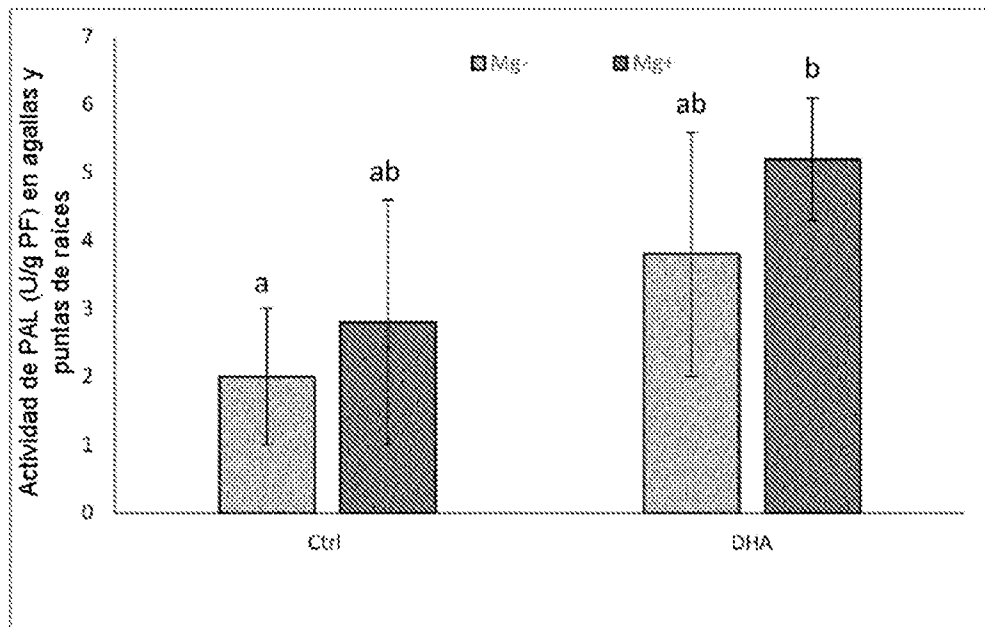


Figura 10

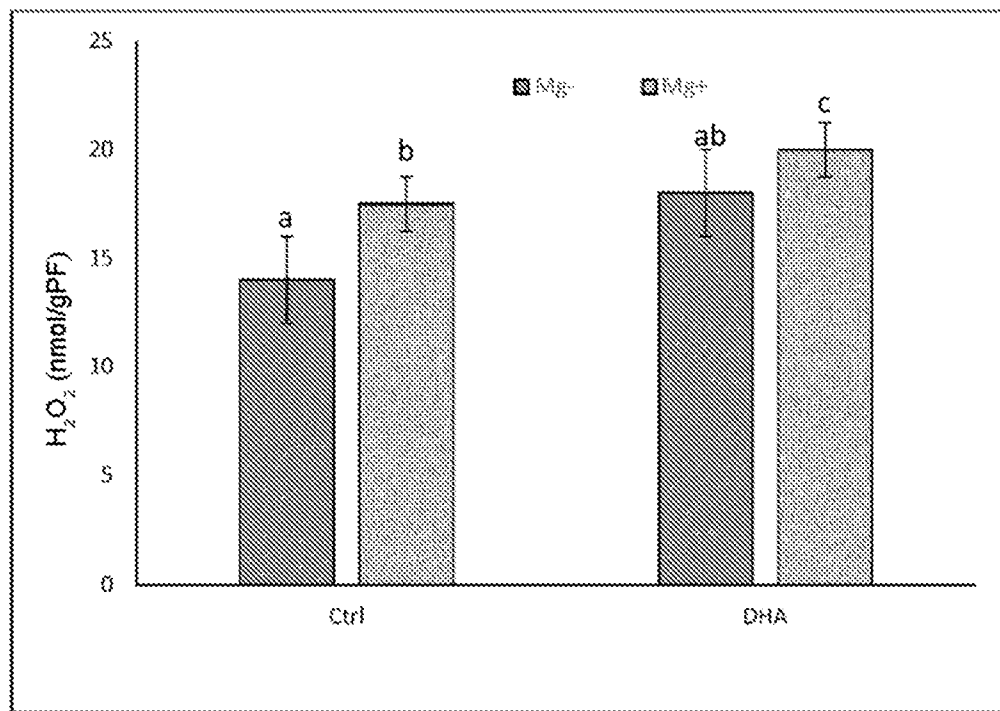


Figura 11

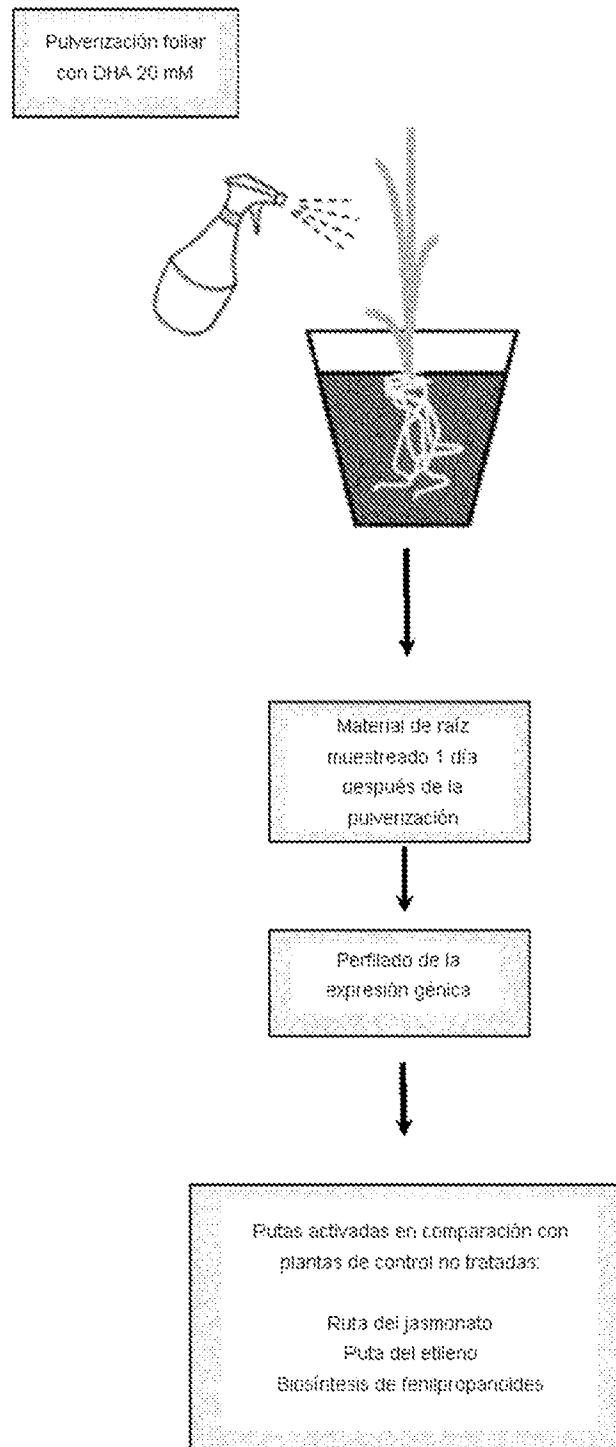


Figura 12