

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 534**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2021** **PCT/EP2021/071800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2022** **WO22029192**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2021** **E 21746308 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025** **EP 4192246**

54 Título: **Elicitores de defensa contra patógenos vegetales**

30 Prioridad:

05.08.2020 EP 20189578

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

23.04.2025

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES (100.00%)
Avenue F.D. Roosevelt 50
1050 Bruxelles, BE

72 Inventor/es:

CANNELLA, DAVID y
ZARATTINI, MARCO

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 3 014 534 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

Elicitores de defensa contra patógenos vegetales

5 Campo

La invención se encuentra, en general, en el campo de compuestos y composiciones fitofarmacéuticas y, en particular, se refiere a elicitores de las defensas vegetales naturales (también conocidos comúnmente como moléculas activadoras del sistema inmunitario vegetal o "bioplaguicidas" en términos accesibles), una clase de moléculas que no dañan el medio ambiente que retrasan la infección y propagación de patógenos microbianos en las plantas, y al uso de los mismos.

Antecedentes

La pared celular vegetal es una estructura dinámica constituida en su gran mayoría por polisacáridos con pesos moleculares altos, es decir celulosa, hemicelulosa y pectina. Esta mezcla compleja confiere integridad estructural y protección física en las células vegetales. Los patógenos vegetales, incluyendo hongos patógenos y bacterias patógenas, utilizan una variedad de estrategias para colonizar las plantas y obtener nutrientes a partir de sus hospederos.

Por ejemplo, para superar la pared celular los fitopatógenos pueden utilizar un consorcio heterogéneo de enzimas conocidas como enzimas degradadoras de la pared celular (CWDE por sus siglas en inglés) (Kubicek *et al.*, "Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi". *Annu Rev Phytopathol.* 2014, vol. 52, 427-51). Aunque se requiere de una variedad de enzimas para descomponer la celulosa en glucosa, la familia de la polisacárido mono-oxigenasa lítica (LPMO por sus siglas en inglés) recientemente descubierta puede estar entre los participantes iniciales en este proceso allanando de esta manera el camino para otras hidrolasas. Las LPMO son una clase de enzimas con cobre que catalizan el corte oxidativo de los enlaces glucosídicos de polisacáridos recalcitrantes incluyendo la celulosa y la quitina, y que están ampliamente distribuidas a través de los reinos bacterianos y fúngicos. Las LPMO actualmente se clasifican en siete familias de "actividad auxiliar" (AA) (AA9, AA10, AA11, AA13, AA14, AA15 y AA16) de acuerdo con la base de datos de enzimas activas para carbohidrato (www.cazy.org). El corte oxidativo controlado por LPMO de los glucanos puede tomar lugar en cualquiera de las posiciones C1 o C4 del anillo de piranosa, lo cual puede producir por lo tanto mezclas de oligosacáridos nativos y oxidados (oxidados en C1 (C1-oxidado), oxidados en C4 (C4-oxidado) y/u doblemente oxidados en C1 y C4 (C1-C4-oxidados)) de diferentes grados de polimerización.

Las células vegetales poseen por lo menos dos capas de defensa parcialmente traslapadas definidas como inmunidad desencadenada por patrón (PTI por sus siglas en inglés) e inmunidad desencadenada por efectores (ETI por sus siglas en inglés), que constituyen el denominado sistema inmunitario vegetal (Jones y Dangl. "The plant immune system". *Nature.* 2006, vol. 444(7117), 323-9). La ETI confiere una estrecha resistencia específica de cepa ya que esta es iniciada después del reconocimiento de efectores de virulencia (proteínas de virulencia A) por los genes de resistencia citoplasmática (genes R). Esto por lo general causa una fuerte acumulación específica de sitio de especies de oxígeno reactivo (ROS por sus siglas en inglés) lo que lleva a la apoptosis. En contraste, la PTI provee una protección de amplio espectro. El patrón molecular asociado a patógenos (PAMP por sus siglas en inglés) evolutivamente conservado es detectado por las plantas a través de una plétora de receptores de reconocimiento de patrón (PRR por sus siglas en inglés) anclados a membrana plasmática (Albert *et al.* "Surface Sensor Systems in Plant Immunity". *Plant Physiol.* 2020, vol. 182(4), 1582-1596). Por ejemplo, la flagelina (FLG22) y la quitina, dos PAMP bien caracterizados, son percibidos por la quinasa tipo receptor de repetición rica en leucina (LRR-RLK por sus siglas en inglés), tal como FLS2 y CERK1, respectivamente. Además, las plantas pueden autodesencadenar la PTI reconociendo los patrones moleculares asociados a daño (DAMP por sus siglas en inglés) (Boller y Felix. "A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors". *Annu Rev Plant Biol.* 2009, vol. 60, 379-406; Jones y Dangl. 2006, *supra*). Los DAMP pueden comprender ciertas moléculas derivadas de la pared celular, así como péptidos asociados con estrés sintetizados *de novo*. En particular, los fragmentos de pectina y los oligogalacturónidos (OG por sus siglas en inglés) son DAMP prominentes que se sabe son reconocidos por los receptores de quinasas asociadas a pared celular (WAK por sus siglas en inglés) (Kohorn *et al.*, "Cell Wall-Associated Kinases and Pectin Perception". *J Exp Bot.* 2016, vol. 67(2), 489-94; Ferrari *et al.*, "Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development". *Front. Plant Sci.* 2013, vol. 4, 49). Los eventos de señalización comunes que subyacen a PTI implican influjo de Ca²⁺ hacia el citoplasma, activación de cascadas de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK por sus siglas en inglés), acumulación de especies de oxígeno reactivo (ROS) apoplásicas y una reprogramación transcripcional extensiva que incluye factores de transcripción (Yu *et al.*, "From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition". *Annu Rev Phytopathol.* 2017, vol. 55, 109-137). Concomitante con las respuestas transcripcionales durante la PTI, las plantas producen diferentes hormonas de señalización tales como ácido salicílico (SA por sus siglas en inglés), ácido jasmónico (JA por sus siglas en inglés) y etileno (ET por sus siglas en inglés), mientras que la deposición de callosa en la pared celular ocurre unas cuantas horas después de la activación de la PTI.

Los compuestos, que cuando son percibidos por una planta dan origen a dichas respuestas de defensa son referidos comúnmente como elicitores de defensa contra patógenos vegetales, elicitores vegetales o simplemente elicitores. Previamente, se han llevado a cabo estudios sobre las propiedades elicitoras de los oligogalacturonidos (OG) una clase de DAMP que se derivan de la hidrólisis de pectina catalizada por las enzimas poligalacturonasa (PG por sus siglas en inglés) (Ferrari et al. 2013, *supra*). Sólo hasta hace poco, se identificó que algunos otros compuestos que se derivan de la pared celular, en particular celobiosa, xiloglucano y β -1,3-glucano no ramificado actúan como DAMP (Souza et al., "Cellulose-derived oligomers act as damage-associated molecular patterns and trigger defense-like responses". *Plant Physiol.* 2017, vol. 173, 2383–2398; Claverie et al., "The Cell Wall-Derived Xyloglucan Is a New DAMP Triggering Plant Immunity in *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana*". *Front. Plant Sci.* 2018, vol. 9, 1725; Mérida, et al., "Non-branched β -1,3-glucan oligosaccharides trigger immune responses in *Arabidopsis*". *Plant J.* 2018, vol. 93(1), 34-49).

El documento WO 2012/101106 se refiere a una composición para proteger plantas contra patógenos vegetales que comprende: a) un elicitor que comprende uno o más oligo-galacturonano(s) con un grado de polimerización de entre 9 y 20 y uno o más quito-oligosacárido(s) con un grado de polimerización superior a 5 y un grado de acetilación inferior al 50 % en proporciones que varían de 1:50 a 50:1, y b) un fungicida seleccionado del grupo que comprende: fosfonatos, benzamidas, carbamatos, ditiocarbamatos, ftalimidas, triazoles, quinolinas, azufre y cianoimidazoles. El documento también se refiere al uso de estas composiciones en aplicaciones agrícolas, más concretamente para proteger las plantas contra (la infección por) patógenos vegetales y los correspondientes métodos y usos en la protección de plantas y cultivos mediante la aplicación de estas composiciones.

La industria agrícola está involucrada en una pelea implacable contra patógenos vegetales, exacerbada por un entorno que constantemente cambia debido a, entre otras cosas cambios del clima, al esfuerzo por evitar grandes pérdidas económicas anuales y a la incertidumbre en la cadena de suministro de alimentos. Aunque solo una pequeña variedad de compuestos químicos está en uso común como plaguicidas o fungicidas, incluso este reservorio está disminuyendo, debido a la resistencia biológica emergente en los patógenos vegetales y por los efectos secundarios de algunos de estos compuestos químicos en la salud humana. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevos compuestos y composiciones para protección de plantas.

Sumario

Como queda evidenciado por la sección experimental, la cual muestra ciertas realizaciones ilustrativas de la invención, los presentes inventores han demostrado por primera vez que el ácido celobiónico actúa como un potente elicitador de defensa vegetal. Además, los inventores han demostrado que las composiciones que comprenden celodextrinas oxidadas, así como las composiciones que comprenden celodextrinas tanto nativas como oxidadas, tal como en particular composiciones que comprenden una o más celodextrinas nativas en combinación con una o más celodextrinas C1-oxidadas, una o más celodextrinas C4-oxidadas y/o una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas (es decir, celodextrinas doblemente oxidadas), muestran potencial elicitador vegetal conveniente. En algunos ejemplos, los inventores han mostrado fuerte actividad elicitora vegetal para mezclas de celodextrinas nativas y oxidadas producidas por la descomposición de celulosa por una o más polisacárido mono-oxigenasas líticas (LPMO).

Por consiguiente, la presente invención proporciona la materia objeto expuesta en todas y cada una de las reivindicaciones anexas 1 a 15.

Por consiguiente, un aspecto de la invención provee el uso de ácido celobiónico o una sal fitofarmacéuticamente aceptable del mismo como elicitador de defensa contra patógenos vegetales. Un aspecto relacionado se refiere a un método para activar la defensa vegetal contra patógenos vegetales que comprende poner en contacto una planta con una cantidad efectiva de ácido celobiónico o una sal fitofarmacéuticamente aceptable del mismo. Un aspecto adicional provee una composición fitofarmacéutica que comprende ácido celobiónico o una sal fitofarmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo fitofarmacéuticamente aceptable que comprende o que se selecciona a partir de uno o más agentes tensoactivos aniónicos, no iónicos, anfóteros o catiónicos, o una combinación de los mismos.

Un aspecto adicional no de acuerdo con la invención reivindicada provee el uso de (i) una o más celodextrinas (es decir, celodextrinas nativas o no oxidadas) y (ii) una o más celodextrinas C1-oxidadas (ácidos aldónicos) o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas, una o más celodextrinas C4-oxidadas (4-cetoaldosas o gemdiones) y/o una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas (ácidos 4-ceto-oligosacárido-1-aldónicos) o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas, tal como en una composición que comprende estos componentes, como elicitador de defensa contra patógenos vegetales. Un aspecto relacionado no de acuerdo con la invención reivindicada se refiere a un método para activar la defensa vegetal contra patógenos vegetales que comprende poner en contacto una planta con una cantidad efectiva de los componentes (i) y (ii) antes mencionados. Un aspecto adicional no de acuerdo con la invención reivindicada provee una composición fitofarmacéutica que comprende los componentes (i) y (ii) antes mencionados, y un vehículo fitofarmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo fitofarmacéuticamente aceptable que comprende uno o más agentes tensoactivos aniónicos, no iónicos, anfóteros o catiónicos, o una combinación de los mismos.

Un aspecto adicional no de acuerdo con la invención reivindicada provee el uso de una o más celodextrinas C4-oxidadas (es decir, 4-cetoaldosas o gemdiores) como elicitores de defensa contra patógeno vegetal. Un aspecto relacionado no de acuerdo con la invención reivindicada se refiere a un método para activar la defensa vegetal contra patógenos vegetales que comprende poner en contacto una planta con una cantidad efectiva de una o más celodextrinas C4-oxidadas. Un aspecto adicional no de acuerdo con la invención reivindicada provee una composición fitofarmacéutica que comprende una o más celodextrinas C4-oxidadas y un vehículo fitofarmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo fitofarmacéuticamente aceptable que comprende uno o más agentes tensoactivos aniónicos, no iónicos, anfóteros o catiónicos, o una combinación de los mismos.

Un aspecto adicional de la invención provee el uso de una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas (es decir, doblemente oxidadas) (es decir, ácidos 4-ceto-oligosacárido-1-aldónicos) o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas, como elicitores de defensa contra patógeno vegetal. Un aspecto relacionado se refiere a un método para activar la defensa vegetal contra patógenos vegetales que comprende poner en contacto una planta con una cantidad efectiva de una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas. Un aspecto adicional provee una composición fitofarmacéutica que comprende una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas y un vehículo fitofarmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo fitofarmacéuticamente aceptable que comprende uno o más agentes tensoactivos aniónicos, no iónicos, anfóteros o catiónicos, o una combinación de los mismos.

También se proveen métodos y usos que utilizan la composición fitofarmacéutica para inducir protección vegetal contra patógenos.

Estos aspectos y aspectos adicionales y realizaciones preferidas de la invención se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones anexas. Mediante la presente se incorpora específicamente en esta descripción la materia objeto de las reivindicaciones anexas.

Breve descripción de las figuras

La **Fig. 1** ilustra **(A)** la expresión de genes de las LPMO durante la interacción *Arabidopsis* – *B. cinerea*. Plantas de *Arabidopsis* de cinco semanas de edad se tratan mediante goteo con esporas de *B. cinerea* (10^5 esporas ml^{-1}) y la expresión de genes de las LPMO se evalúa 48 horas después de la infección con el hongo; **(B)** Comparación basada en secuencia de BcAA9s con AA9s caracterizadas bioquímicamente y estructuralmente. El árbol filogenético se crea tomando como base la alineación de los módulos catalíticos solamente. La regioespecificidad oxidativa (C1, azul; C4, verde; C1/C4, rojo) se indica para LPMO caracterizada. Las AA9s provenientes de *B. cinerea* están marcadas con flechas. **(C)** La comparación estructural entre TtAA9E y BCIN_12g03920 se construye utilizando el Servidor Swiss-Model y la estructura cristalina de TtAA9E obtenida del banco de datos de proteínas (PDB:3E1I). Los modelos estructurales se muestran en representación de cinta y el ion cobre se muestra como una esfera de color azul. **(D)** El análisis HPAEC-PAD de los productos generados por TtAA9E utilizando PASC al 0,5 % (p/v) como un sustrato celulósico. Glc2: celobiosa, Glc3: celotriosa, Glc4: celotetraosa, Glc5: celopentaosa, GlcGlc1A: ácido celobiónico, Glc2Glc1A: ácido celotriónico, Glc3Glc1A: ácido celotetraónico, Glc4Glc1A: ácido celopentaónico, Glc5Glc1A: ácido celohexaónico, Glc6Glc1A: ácido celoheptaónico, Glc7Glc1A: ácido celooctaónico.

La **Fig. 2** ilustra la expresión de los genes *FRK1* y *WRKY18* en *Arabidopsis* en respuesta a concentraciones diferentes de AA9_COS. La expresión de los genes *FRK1* y *WRKY18* se evalúa en plantas de *Arabidopsis* de 14 días de edad 1 hora después del tratamiento con concentraciones cada vez mayores de AA9_COS. Las diferentes letras corresponden a niveles de expresión significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

La **Fig. 3** ilustra el análisis de cambios transcriptómicos tempranos en plántulas de *Arabidopsis* tratadas con productos de LPMO (AA9_COS) y celobiosa. **(a)** Genes expresados de manera diferencial 1 hora después del tratamiento con celodextrinas AA9_COS 100 μM y celobiosa 100 μM . **(b)** Análisis de componente principal de genes expresados de manera diferencial (DEG por sus siglas en inglés) inducidos por tratamientos con AA9_COS, celobiosa y simulación. Las similitudes generales de la expresión de genes entre las muestras se visualizan utilizando dos componentes principales (PC1 y PC2), que capturan el 39 % y 19 % de la variación total, respectivamente. **(c y d)** La gráfica de volcán se genera utilizando las relaciones de expresión de gen (cambio en número de veces de $\log_2$) graficadas contra los valores de p de la prueba de la t de Student transformados a $\log_{10}$ negativos. Los puntos de datos representan la expresión de genes modulados por tratamientos con AA9_COS **(c)** o celobiosa **(d)**, respectivamente.

La **Fig. 4** ilustra que los genes inducidos por AA9_COS el producto de LPMO están relacionados con la defensa contra patógenos. El análisis de enriquecimiento del término de ontología de genes (GO por sus siglas en inglés) relacionado con procesos biológicos de 668 genes significativamente activados revela el enriquecimiento de las respuestas de defensa vegetal. El análisis de GO se realiza utilizando el software g:Profiler (Benjamini-Hochberg FDR $< 0,05$) y la función EnrichmentMap de Cytoscape. Cada nodo representa una ruta, los bordes representan genes traslapados entre los nodos y el tamaño del círculo representa el número de genes abarcados.

La **Fig. 5** ilustra la comparación entre los cambios transcriptómicos inducidos por los tratamientos con AA9_COS (COS) o con celobiosa (CB). **(a)** Análisis de agrupamiento jerárquico de los patrones de expresión de genes que muestra cambios de expresión significativos en comparación con la simulación (valor de $p \leq 0,05$ y cambio en número de veces de $\log_2$ ($\log_2FC$ por sus siglas en inglés) $\geq 1,5$) 1 hora después de los tratamientos con AA9_COS o CB en plantas Col-0 de 14 días de edad. Los grupos se dividen en genes activados (panel izquierdo, además del grupo 5, el cual muestra patrones opuestos de expresión entre los tratamientos: activación por AA9_COS y represión por celobiosa) o reprimidos (panel derecho). **(b)** La proporción de genes relacionados con la respuesta de defensa del término de GO relativo evaluado por grupo. **(c)** Mapa de calor de genes de defensa seleccionados que pertenecen al grupo I, II y III. **(d)** Diagrama de Venn que muestra genes activados y reprimidos específicos y compartidos inducidos por los tratamientos con AA9_COS y CB. **(e)** El análisis de enriquecimiento de ontología de genes realizados con PSGEA indica que los genes relacionados con la defensa fueron activados por los tratamientos tanto con AA9_COS como con celobiosa. $-\log_2(FDR)$ denota la significancia del enriquecimiento de ontología de genes.

La **Fig. 6** ilustra el efecto de AA9_COS y de los componentes individuales ácido celobiónico ("Biónico") o ácido celotriónico ("Triónico") sobre la activación de 3 genes marcadores (*CYB81F2*, *RBOHD* y *WRKY30*).

La **Fig. 7** ilustra la correlación entre los datos de microarreglo y los de qPCR. El cambio en número de veces de la expresión de genes determinado mediante qPCR y mediante microarreglo de ADNc se grafica para un subconjunto de 10 genes expresados de manera diferencial en *Arabidopsis*. El R^2 y FDR indican buena correlación entre los resultados de PCR en tiempo real y los del microarreglo.

La **Fig. 8** ilustra que AA9_COS no desencadena un estallido oxidativo. Se proveen imágenes representativas de hojas teñidas con DAB **(a)** o NBT **(b)** provenientes de plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis* de 4 a 5 semanas 24 horas después de los tratamientos. **(c)** La prueba basada en luminol para detección de peróxido de hidrógeno muestra que ni el tratamiento con AA9_COS ni el tratamiento con celobiosa desencadenan la formación de estallido oxidativo detectable en plantas de *Arabidopsis*. Se etiqueta la curva de control positivo de H_2O_2 . Las curvas traslapadas que representan tratamientos diferentes se etiquetan con "otro". Se utilizan MV, metilviologen y NaCl, cloruro de sodio, como controles positivos.

La **Fig. 9** ilustra que AA9_COS induce resistencia contra *B. cinerea*. Las hojas sueltas provenientes de plantas de *Arabidopsis* de 5 semanas de edad se salpican con 10 μ l de suspensión de esporas (10^5 esporas/ml). **(a)** Tres días después de la infección se toman las fotografías y se determina el área de la lesión con ImageJ **(b)**. **(c)** El crecimiento de *B. cinerea in planta* se determina mediante qPCR 3 días después de la inoculación utilizando genes de mantenimiento específicos para *Arabidopsis* (*AtSKII*) y *B. cinerea* (*BcTUB*). **(d)** La callosa se determina 6 y 24 horas después de los tratamientos en plantas de 5 semanas de edad. **(e)** Fotografías representativas 24 horas después de los tratamientos indicados, las barras indican 500 μ m.

La **Fig. 10** ilustra que el tratamiento con celodextrinas desencadena la señalización de camalexina en *Arabidopsis*. **(a)** La expresión de los genes implicados en la señalización y biosíntesis de camalexina se evalúa en plantas de *Arabidopsis* de 14 días de edad 1 y 24 horas después de los tratamientos con AA9_COS 100 μ M o celobiosa 100 μ M. Los valores de la mediana se grafican en los recuadros con los datos generados a partir de dos repeticiones biológicas independientes. Las diferentes letras corresponden a niveles de expresión que son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney (significancia ajustada a $p < 0,05$), **(b)** Modelo propuesto para la regulación con AA9_COS de la biosíntesis y señalización de camalexina, **(c)** Cuantificación de camalexina y **(d)** Cuantificación inmunohistoquímica temprana o análisis de transferencia Western de la fosforilación de MPK3/6 después de los tratamientos indicados.

La **Fig. 11** ilustra la expresión génica de genes marcadores seleccionados en plantas SIF2 mutantes con expresión suprimida (knock-out) ("SIF2") 1 hora después del tratamiento con celodextrinas AA9_COS ("CD") 100 μ M. Se incluyen los controles Tipo silvestre ("Col-0") y simulación ("sim. ").

La **Fig. 12** ilustra la actividad elicitora vegetal de diferentes concentraciones de AA9_COS en tomates.

La **Fig. 13** ilustra la actividad elicitora vegetal de celobiosa vs. AA9_COS en tomates.

La **Fig. 14** ilustra la actividad elicitora vegetal de varias combinaciones de celodextrinas nativas y celodextrinas C1-oxidadas, C4-oxidadas, y opcionalmente C1 y C4-oxidadas (doblemente oxidadas).

La **Fig. 15** ilustra la emanación de etileno.

La **Fig. 16** ilustra la cuantificación de fitohormonas. (Paneles superiores) Los contenidos de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) se cuantifican mediante cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas en tándem-ionización por electroaspiración (HPLC-ESI-MS/MS por sus siglas en inglés). Tres combinados ($n = 3$) de quince hojas provenientes de tres plantas de *Arabidopsis* de cinco semanas de edad se tratan con 100 μ M de AA9_COS o de simulación y las hojas se recolectan, se combinan y se congelan inmediatamente en nitrógeno

líquido 24 horas después de los tratamientos. Para cada combinado independiente, se realiza la extracción y cuantificación de JA y SA. Las barras representan la media y la desviación estándar de tres combinados, los asteriscos indican diferencias significativas (prueba de ANADEVa unifactorial). (Panel inferior). El etileno se mide en un análisis de curso de tiempo utilizando cajas cuadradas que contienen cada una 100 plántulas de catorce días de edad. Las barras representan la media y el error estándar de ocho cajas cuadradas independientes ($n = 8$). Los asteriscos indican diferencias significativas (prueba de ANADEVa unifactorial). DW: peso seco. FW: peso fresco.

Descripción detallada de la invención

Tal como se utilizan en la presente solicitud, las formas en singular "un", "uno(a)" y "el (la)" incluyen los referentes tanto en singular como en plural a menos que el contexto claramente dicte lo contrario.

Las expresiones "que comprende", "comprende" y "que consiste en" tal como se utilizan en la presente solicitud son sinónimos de "incluyendo", "incluye" o "que contiene", y son inclusivas o abiertas y no excluyen miembros, elementos o etapas del método no citados, adicionales. Las expresiones también abarcan "que consiste en" y "que consiste esencialmente en", las cuales disfrutan de significados bien establecidos en la terminología de patentes.

La recitación de intervalos numéricos mediante puntos finales incluye todos los números y fracciones subsumidas dentro de los intervalos respectivos, así como los puntos finales recitados. Esto aplica a intervalos numéricos independientemente de si estos son o no introducidos por la expresión "de... a..." o la expresión "entre... y..." u otra expresión.

El término "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente solicitud cuando se hace referencia a un valor mensurable tal como un parámetro, una cantidad, una duración de tiempo y similares, pretende abarcar variaciones de y desde el valor especificado, tal como variaciones de $\pm 10\%$ o menos, preferentemente $\pm 5\%$ o menos, de manera más preferida $\pm 1\%$ o menos, y de manera incluso más preferida $\pm 0,1\%$ o menos de y desde el valor especificado, en tanto que dichas variaciones sean apropiadas para realizar en la invención descrita. Se debe entender que el valor al cual se refiere el modificador "aproximadamente" es por sí mismo también descrito específicamente, y en forma preferida.

Mientras que las expresiones "uno o más" o "por lo menos uno", tal como uno o más miembros o por lo menos un miembro de un grupo de miembros, sean claras en sí, por medio de ejemplificación adicional, la expresión abarca, entre otras cosas, una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a cualquiera de dos o más de dichos miembros, tal como, por ejemplo, cualquiera ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 o ≥ 7 etc. de dichos miembros y hasta todos de dichos miembros. En otro ejemplo, "uno o más" o "por lo menos uno" se puede referir a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más.

La discusión de los antecedentes de la invención en la presente solicitud se incluye para explicar el contexto de la invención. Esto no debe tomarse como una admisión que cualquiera del material al que se refiere se publicó, conoció o parte del conocimiento general común en cualquier país como la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos y expresiones utilizados para describir la invención, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Por medio de guía adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la invención. Cuando se definen términos específicos en conexión con un aspecto particular de la invención o una realización particular de la invención, se pretende que dicha connotación o significado se aplique a lo largo de esta descripción, es decir, también en el contexto de otros aspectos o realizaciones de la invención, a menos que se defina de otra manera.

La invención se define en las reivindicaciones anexas.

Los aspectos de la invención se refieren al uso de ácido celobiónico o una sal fitofarmacéuticamente aceptable del mismo como elicitador de defensa contra patógenos vegetales.

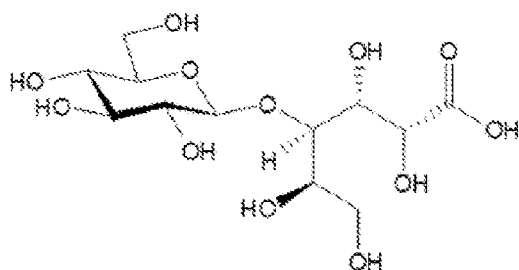
Aspectos adicionales no de acuerdo con la invención reivindicada se refieren a:

composiciones que comprenden (i) una o más celodextrinas (es decir, celodextrinas nativas o no oxidadas) y (ii) una o más celodextrinas C1-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas, una o más celodextrinas C4-oxidadas y/o una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas; una o más celodextrinas C4-oxidadas; o una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas; como elicitador de defensa contra patógenos vegetales.

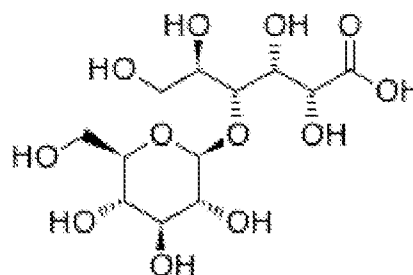
También se proveen métodos correspondientes para activar la defensa vegetal contra patógenos vegetales que

comprenden poner en contacto una planta con una cantidad efectiva de dichas sustancias o composiciones, al igual que composiciones fitofarmacéuticas que comprenden dichas sustancias y un vehículo fitofarmacéuticamente aceptable. Dichos métodos también pueden ser considerados como aquellos para obtener una planta que sea resistente a un patógeno.

El ácido celobiónico es un disacárido que consiste en residuos de beta-D-glucosilo y ácido D-glucónico unidos por un enlace (1→4). Los nombres químicos incluyen ácido 4-O-β-D-glucopiranosil-D-glucónico, ácido 4-O-β-D-glucosil-D-glucónico, ácido β-D-glucosil-(1→4)-D-glucónico y ácido maltobiónico. El compuesto es por lo tanto un disacárido y un ácido de carbohidrato, muestra la fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{12}$ y se puede ilustrar mediante cualquiera de las fórmulas estructurales representativas (I) o (II):

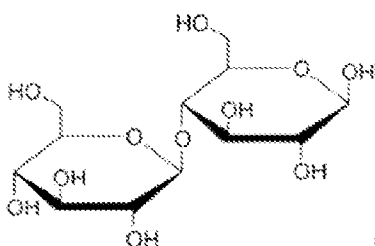


(I)

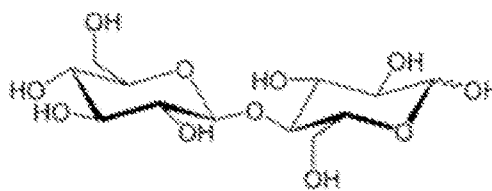


(II)

Por lo tanto, el ácido celobiónico también se puede ver como la forma C1-oxidada de la celobiosa o un homólogo de ácido aldónico de celobiosa. La celobiosa es un disacárido que consiste en 2 unidades de glucosa unidas mediante un enlace beta (1→4), es decir, β-D-glucopiranosil(1→4)D-glucopiranososa, con la fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ y puede ilustrarse mediante cualquiera de las fórmulas estructurales representativas formulas (III) o (IV):



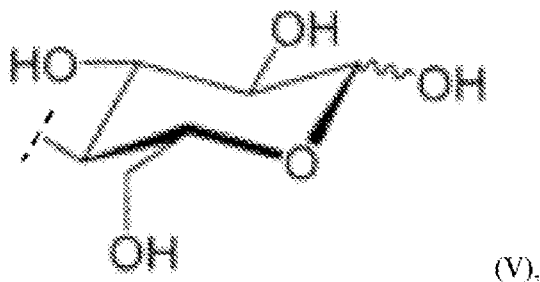
(III)



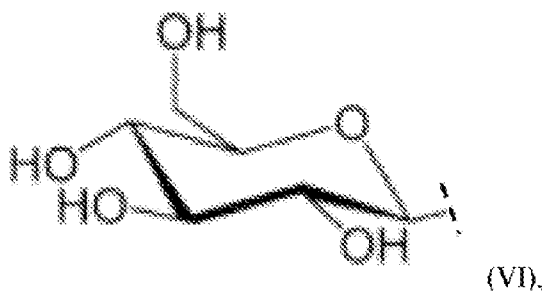
(IV)

El término "celodextrina" se refiere a cualquiera de o a una población o mezcla de dos o más carbohidratos de bajo peso molecular constituidos por dos o más monómeros de glucosa unidos con enlaces beta (1→4). Por lo tanto, las celodextrinas se pueden representar como β-1,4-D-gluco-oligosacáridos lineales. Las celodextrinas se pueden producir típicamente mediante hidrólisis de celulosa, tal como particularmente mediante hidrólisis enzimática de la celulosa. Por lo tanto, a manera de ilustración, la celobiosa es una celodextrina constituida por dos monómeros de glucosa unidos con enlaces beta (1→4), mientras que la celotriosa, celotetraosa y celopentosa son celodextrinas constituidas por tres, cuatro y cinco monómeros de glucosa unidos con enlaces beta (1→4, respectivamente. El número de monómeros de glucosa enlazados en una celodextrina, es decir, el grado de polimerización (DP por sus siglas en inglés) de una celodextrina, puede ser variable, tal como sin limitación de 2 a 20, o de 2 a 15, o de 2 a 10, tal como por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Por ejemplo, una población o mezcla de celodextrinas puede contener celodextrinas con una variedad de grados de polimerización, tal como celodextrinas con DP de 2 a 20, o de 2 a 15, o de 2 a 10, o de 2 a 8. A manera de ejemplos y sin limitación, el grado de polimerización promedio en número o promedio en peso de una población o mezcla de celodextrinas puede estar entre 2 y 10, tal como entre 3 y 7, tal como por ejemplo aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6 o aproximadamente 7.

Por consiguiente, el término "celodextrina" cuando se utiliza en la presente solicitud sin calificación adicional se refiere particularmente a celodextrinas nativas o a poblaciones o mezclas que celodextrinas nativas. "Nativo" en este contexto significa que ni el átomo de carbono anomérico libre en la posición 1 (C1) de la porción glucosa en el extremo reductor de las celodextrina, ni el carbono en la posición 4 (C4) de la porción glucosa en el extremo no reductor de la celodextrina están oxidados adicionalmente. En otras palabras, en una celodextrina nativa la porción glucosa en el extremo reductor de la celodextrina se puede representar de la siguiente manera (fórmula V),



y la porción glucosa en el extremo no reductor de la celodextrina se puede representar de la siguiente manera (fórmula VI):



5

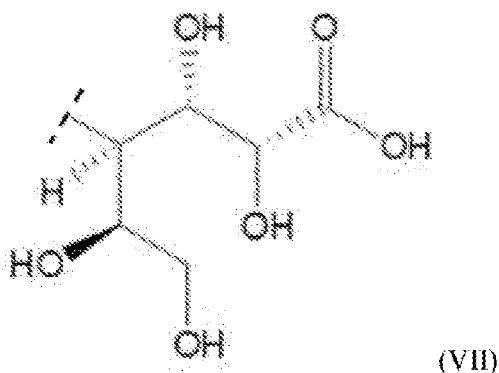
en las cuales la línea punteada indica el punto de unión (mediante $-O-$) al resto de la molécula de celodextrina.

La referencia a "celodextrina oxidada" abarca celodextrinas en las cuales por lo menos un átomo de carbono está oxidado adicionalmente, tal como en particular cuando un átomo de carbono que lleva un grupo hidroxilo ($-OH$) se oxida adicionalmente hasta un átomo de carbono que lleva un grupo oxo ($=O$) o dos grupos hidroxilo ($-OH$), o cuando el carbono del hemiacetal se oxida adicionalmente hasta un grupo carboxilo ($-COOH$). En particular, las celodextrinas oxidadas abarcan celodextrinas C1-oxidadas (ácidos aldónicos), celodextrinas C4-oxidadas (4-cetoaldosas o gemdiones), así como celodextrinas C1 y C4-oxidadas (celodextrinas doblemente oxidadas, ácidos 4-ceto-oligosacárido-1-aldónicos).

15

En las celodextrinas C1-oxidadas, el átomo de carbono anomérico en la posición 1 (C1) de la porción glucosa en el extremo reductor de la celodextrina se oxida hasta un grupo carboxilo, lo que provee una porción ácido glucónico, la cual se puede representar de la siguiente manera (fórmula VII):

20



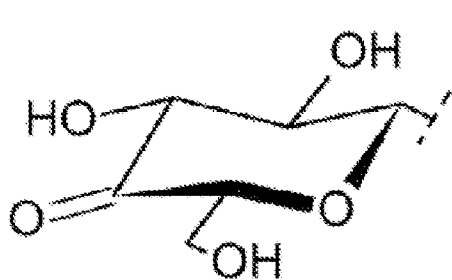
25

en la cual la línea punteada indica el punto de unión (mediante $-O-$) al resto de la molécula de celodextrina C1-oxidada. Los ejemplos no limitativos de celodextrinas C1-oxidadas incluyen oligómeros lineales de la siguiente estructura: ácido (D-glucosil-(1 $\rightarrow$ 4))_n(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucónico, en la cual n es el grado de polimerización menos 1, por ejemplo, en la cual n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Los ejemplos no limitativos de celodextrinas C1-oxidadas incluyen ácido celobiónico (DP=2), ácido celotriónico (DP=3), ácido celotetraónico (DP=4), ácido celopentaónico (DP=5), etc., por ejemplo, DP=6, 7, 8, 9 o 10.

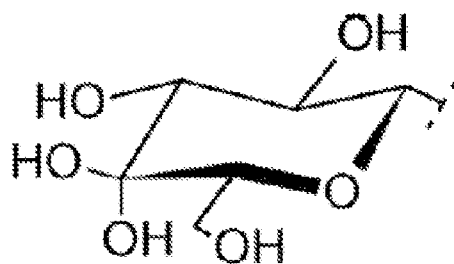
30

En las celodextrinas C4-oxidadas, el átomo de carbono en la posición 4 (C4) de la porción glucosa en el extremo no reductor de la celodextrina está presente como un grupo ceto ($-C(=O)-$) o gemdiol ($-C(OH)_2-$), lo que provee una

porción, la cual se puede representar de la siguiente manera (fórmulas VIII y IX):



(VIII)



(IX)

- 5 en las cuales la línea punteada indica el punto de unión (mediante $-O-$) al resto de la molécula de celodextrina C4-oxidada. Los ejemplos no limitativos de celodextrinas C4-oxidadas incluyen oligómeros lineales de la siguiente estructura: 4-dehidro- β -D-glucosil-(1 $\rightarrow$ 4)(β -D-glucosil-(1 $\rightarrow$ 4)) $_n$, en la cual n es el grado de polimerización menos 1, por ejemplo, en la cual n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Los ejemplos no limitativos de celodextrinas C4-oxidadas incluyen 4-cetocelobiosa (DP=2), 4-cetocelotriosa (DP=3), 4-cetocelotetraosa (DP=4), 4-cetocelopentosa (DP=5), etc., por ejemplo, DP=6, 7, 8, 9 o 10.

- En las celodextrinas C1 y C4-oxidadas (es decir, doblemente oxidadas), se aplica lo anterior. Los ejemplos no limitativos de celodextrinas C1 y C4-oxidadas incluyen oligómeros lineales de la siguiente estructura: ácido 4-dehidro- β -D-glucosil-(1 $\rightarrow$ 4)(β -D-glucosil-(1 $\rightarrow$ 4)) $_m$ (1 $\rightarrow$ 4)-D-glucónico, en la cual m es el grado de polimerización menos 2, por ejemplo, en la cual m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5. Dichas moléculas también se pueden denotar como ácido 4-ceto-biosa-1-aldónico (DP=2), ácido 4-ceto-triosa-1-aldónico (DP=3), ácido 4-ceto-tetraosa-1-aldónico (DP=4), ácido 4-ceto-pentosa-1-aldónico (DP=5), ácido 4-ceto-hexosa-1-aldónico (DP=6), etc., por ejemplo, DP=7, 8, 9 o 10.

- En las celodextrinas C1-oxidadas, C4-oxidadas y C1 y C4-oxidadas como se pretende en la presente solicitud, los estados de oxidación de los átomos de carbono distintos del carbono C1 de la porción ácido glucónico y/o el carbono C4 de la porción 4-cetoglucosa en el extremo no reductor preferentemente son los mismos que en una ciclodextrina nativa.

- La referencia a cualquier compuesto como se pretende en la presente solicitud, tal como ácido celobiónico o una celodextrina nativa u oxidada, puede abarcar el compuesto dado, así como cualesquiera formas fitofarmacéuticamente aceptables de dicho compuesto, tal como cualesquiera sales de adición, hidratos o solvatos del compuesto. La expresión "fitofarmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en la presente solicitud entre otras cosas en conexión con las formas de compuestos tales como sales, hidratos, solvatos, así como en conexión con portadores (tal como vehículos, soportes, disolventes, etc.), es consistente con la técnica y significa no perjudicial para la planta receptora, tal como no produce ningún efecto adverso cuando se aplica a una planta o a un órgano de la planta, y en donde sea aplicable, compatible con cualesquiera otros ingredientes de una composición fitofarmacéutica. Las sales de adición de ácido y base fitofarmacéuticamente aceptables pretenden comprender las formas de sal de adición de ácido y base fitofarmacéuticamente activas no tóxicas que el compuesto es capaz de formar. Dichas sales se pueden obtener de manera conveniente tratando la forma de base de un compuesto con un ácido apropiado. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tal como los ácidos halohídricos, por ejemplo ácido clorhídrico o bromhídrico, los ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tal como, por ejemplo, los ácidos acético, propanoico, ascórbico, gálico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, malónico, succínico (es decir ácido butanodioico), maleico, fumárico, deshidroascórbico, málico, tartárico, cítrico, metansulfónico, etansulfónico, bencensulfónico, p-toluensulfónico, ciclámico, salicílico, p-aminosalicílico, pamoico, cumárico, ferúlico, caféico, sinápico, cinámico, resveratrol, catequina, 3-hidroxil-antranílico, L-DOPA, melanina, eumelanina, lignoles, ácido vanílico, vainillina y similares. Por el contrario, dichas formas de sal se pueden convertir mediante tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre. Un compuesto que contenga un protón ácido (tal como ácido celobiónico, ácidos aldónicos) también se puede convertir en sus formas de adición metálicas o aminadas no tóxicas mediante tratamiento con bases orgánicas e inorgánicas apropiadas. Las formas de sal básica apropiadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metal alcalino y alcalinotérreo, por ejemplo las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales de aluminio, sales de zinc, sales con bases orgánicas, por ejemplo aminas alifáticas y aromáticas primarias, secundarias y terciarias tal como metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, los cuatro isómeros de butilamina, dimetilamina, dietilamina, dietanolamina, dipropilamina, diisopropilamina, di-n-butilamina, pirrolidina, piperidina, morfolina, trimetilamina, trietilamina, tripropilamina, quinuclidina, piridina, quinolina e isoquinolina; las sales de benzatrina, N-metil-D-glucamina, hidrabamina y las sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares. Por el contrario, la forma salina se puede convertir mediante tratamiento con ácido en la forma de ácido libre. El término solvato comprende los hidratos y las formas de adición de disolvente que el compuesto es capaz de formar, así como las sales de los mismos. Los ejemplos de dichas formas son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos y similares.

Cualquier compuesto como se pretende en la presente solicitud puede ser una parte de una composición. El término "composición" generalmente se refiere a una cosa constituida por dos o más componentes, y de manera más específica denota particularmente una mezcla o una combinación de dos o más materiales, tales como elementos, moléculas, sustancias, moléculas biológicas o materiales microbiológicos, así como productos de reacción y productos de descomposición formados a partir de los materiales de la composición. A manera de un ejemplo, una composición puede comprender cualquier compuesto como se enseña en la presente solicitud en combinación con uno o más de otros compuestos o sustancias, sea esto uno o más de otros compuestos como se enseña en la presente solicitud o uno o más de otros compuestos o sustancias. Por ejemplo, se puede obtener una composición combinando, tal como mezclando, un compuesto como se enseña en la presente solicitud con dichos uno o más de otros compuestos o sustancias. Por ejemplo, se puede obtener una composición descomponiendo un material de partida, tal como celulosa, en una mezcla de una pluralidad de productos de descomposición. En algunas realizaciones, las presentes composiciones se pueden configurar como composiciones fitofarmacéuticas. Las composiciones fitofarmacéuticas típicamente comprenden uno o más ingredientes activos (materiales química y/o biológicamente activos que tienen uno o más efectos benéficos en la salud vegetal) y uno o más portadores fitofarmacéuticamente aceptables. Las composiciones típicamente utilizadas en la presente solicitud pueden ser líquidas, semisólidas (por ejemplo, gel), sólidas, o volátiles o basadas en vapor, y pueden incluir soluciones o dispersiones, tal como por ejemplo suspensiones, emulsiones, emulsiones aceite en agua, emulsiones agua en aceite, solución o dispersión acuosa gelificada, soluciones que comprenden un disolvente orgánico volátil, etc. Los ejemplos de formas sólidas incluyen, sin limitación, polvo, gránulos, comprimidos, polvo dispersable en agua, gránulos dispersables en agua o comprimidos dispersables en agua. La composición se puede formular como un concentrado que será diluido antes de usar, tal como, por ejemplo, un concentrado soluble, un concentrado emulsificable, un concentrado líquido y similares.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "portador" incluye ampliamente cualquiera y todos los disolventes, diluyentes, agentes para volumen, amortiguadores para control de pH, dispersantes, solubilizantes, agentes tensoactivos, agentes humectantes, emulsificantes, viscosificantes, espesantes, aglutinantes, conservadores, antioxidantes, moléculas solubilizadoras de cutícula, sustancias minerales naturales o regeneradas y similares, y combinaciones de los mismos. Dichos materiales no deben ser no tóxicos para las plantas y no deben interferir con la actividad de los activos.

Un ejemplo preferido de un disolvente fitofarmacéuticamente aceptable es agua, por lo tanto, las composiciones como se enseñan en la presente solicitud pueden comprender agua, es decir, pueden ser soluciones o dispersiones acuosas. Los ejemplos adicionales de disolventes apropiados incluyen, pero no se limitan a, hidrocarburos aromáticos, tal como, por ejemplo, mezclas de xileno o naftalenos sustituidos; ftalatos, tal como, por ejemplo, ftalato de dibutilo o ftalato de dioctilo; hidrocarburos alifáticos, tal como, por ejemplo, ciclohexano o parafinas; alcoholes y glicoles y sus éteres y ésteres, tal como, por ejemplo, etanol, etilenglicol, éter monometílico o monoetilico de etilenglicol; cetonas, tal como, por ejemplo, ciclohexanona; disolventes fuertemente polares, tal como, por ejemplo, N-metil-2-pirrolidona, sulfóxido de dimetilo o dimetil-formamida; aceites vegetales o aceites vegetales epoxidados, tal como, por ejemplo, aceite de coco o aceite de soja epoxidados; y agua. En un aspecto particular, el disolvente es un disolvente volátil, tal como metanol y etanol.

Los ejemplos no limitativos de portadores sólidos incluyen, pero no se limitan a, materiales de relleno minerales naturales, tal como, por ejemplo, calcita, talco, caolín, montmorillonita o atapulguita; ácido silícico altamente disperso o polímeros absorbentes altamente dispersos; piedra pómez, ladrillos rotos, sepiolita o bentonita; calcita o arena; dolomita o residuos vegetales pulverizados.

Las composiciones de acuerdo con la invención reivindicada comprenden uno o más agentes tensoactivos aniónicos, no iónicos, anfóteros o catiónicos, o una combinación de los mismos, tal como sin limitación Tritón X-100 ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$), agente tensoactivo no iónico que tiene una cadena de óxido de polietileno hidrofílica (tal como en promedio 9,5 unidades de óxido de etileno) y un grupo hidrofóbico de hidrocarburo aromático, 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenilo); un agente tensoactivo no iónico de tipo polisorbato tal como monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán (Tween-20), monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitán (Tween-40); y/o un agente tensoactivo de organosilicón no iónico tal como Silwet® L-77 (3-(2-metoxietoxi)propil-metil-bis(trimetilsililo)-silano).

En algunas realizaciones, el ácido celobiónico o la sal del mismo puede estar comprendido en una composición que también comprende una o más celodextrinas; una o más celodextrinas C1-oxidadas, o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas; una o más celodextrinas C4-oxidadas; y/o una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas, o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas.

En algunas realizaciones, dichas una o más celodextrinas C4-oxidadas pueden estar comprendidas en una composición que también comprende una o más celodextrinas; una o más celodextrinas C1-oxidadas, o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas; y/o una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas, o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas.

En algunas realizaciones, dichas una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas o sal de las mismas pueden estar comprendidas en una composición que también comprende una o más celodextrinas; una o más celodextrinas C1-

oxidadas, o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas; y/o una o más celodextrinas C4-oxidadas.

En algunas realizaciones ilustrativas, la composición puede comprender los componentes indicados en la siguiente tabla, '+' indica presencia, '-' indica ausencia, 'A' indica ácido celobiónico o una sal fitofarmacéuticamente aceptable del mismo, 'B' indica una o más celodextrinas nativas, 'C' indica una o más celodextrinas C1-oxidadas distintas del ácido celobiónico o una sal fitofarmacéuticamente aceptable del mismo, 'D' indica una o más celodextrinas C4-oxidadas, y 'E' indica una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas:

Composición	A	B	C	D	E
1	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	-	+	-	-
4	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+
28	+	-	-	+	-
29	+	+	-	+	-
30	+	+	+	-	+
31	+	-	+	+	-
32	+	-	+	+	-
33	+	-	-	+	+
34	+	+	+	+	+
35	+	-	-	-	+
36	+	-	+	+	+

En algunas realizaciones ilustrativas no de acuerdo con la invención reivindicada, la composición puede comprender los componentes indicados en la siguiente tabla, '+' indica presencia, '-' indica ausencia, 'A' indica una o más celodextrinas nativas, 'B' indica una o más celodextrinas C1-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas, 'C' indica una o más celodextrinas C4-oxidadas, y 'D' indica una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas:

Composición	A	B	C	D
7	+	+	-	-
8	+	-	+	-
9	+	-	-	+
10	+	+	+	-
11	+	+	-	+
12	+	-	+	+
13	+	+	+	+

En algunas realizaciones ilustrativas no de acuerdo con la invención reivindicada, la composición puede comprender los componentes indicados en la siguiente tabla, '+' indica presencia, '-' indica ausencia, 'A' indica una o más celodextrinas C4-oxidadas, 'B' indica una o más celodextrinas nativas, 'C' indica una o más celodextrinas C1-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas, y 'D' indica una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas:

Composición	A	B	C	D
14	+	+	-	-
15	+	-	+	-
16	+	-	-	+
17	+	+	+	-
18	+	+	-	+
19	+	-	+	+
20	+	+	+	+

En algunas realizaciones ilustrativas no de acuerdo con la invención reivindicada, la composición puede comprender los componentes indicados en la siguiente tabla, '+' indica presencia, '-' indica ausencia, 'A' indica una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas, 'B' indica una o más celodextrinas nativas, 'C' indica una o más celodextrinas C1-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas, y 'D' indica una o más celodextrinas C4-oxidadas:

Composición	A	B	C	D
21	+	+	–	–
22	+	–	+	–
23	+	–	–	+
24	+	+	+	–
25	+	+	–	+
26	+	–	+	+
27	+	+	+	+

En algunas realizaciones preferidas, el grado de polimerización (DP) de cualquier celodextrina, celodextrina C1-oxidada, celodextrina C4-oxidada y celodextrina C1 y C4-oxidada como se enseña y se utiliza en la presente solicitud puede ser cada uno de manera independiente de 2 a 20, tal como de 2 a 15, o de 2 a 10, o de 2 a 8, o de 2 a 5. En algunas realizaciones preferidas, el grado de polimerización promedio en número o el grado de polimerización promedio en peso de una población o mezcla de las celodextrinas, celodextrinas C1-oxidadas, celodextrinas C4-oxidadas y celodextrinas C1 y C4-oxidadas como se enseña y se utiliza en la presente solicitud puede ser cada uno de manera independiente entre 2 y 10, tal como entre 3 y 7, tal como por ejemplo aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6 o aproximadamente 7.

En algunas realizaciones, la concentración del ácido celobiónico o de la sal del mismo (por ejemplo, en una composición (fitofarmacéutica) como se enseña en la presente solicitud) puede ser de 0,10 μM a 1000 μM , tal como de 0,10 μM a 900 μM , de 0,10 μM a 800 μM , de 0,10 μM a 700 μM , o de 0,10 μM a 600 μM , preferentemente de 0,10 μM a 500 μM , tal como de 0,10 μM a 400 μM , o de 0,10 μM a 300 μM , de manera más preferida de 0,10 μM a 200 μM , de manera incluso más preferida de 0,10 μM a 100 μM , tal como aproximadamente 0,10 μM , aproximadamente 0,50 μM , aproximadamente 1,0 μM , aproximadamente 5,0 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 20 μM , aproximadamente 30 μM , aproximadamente 40 μM , aproximadamente 50 μM , aproximadamente 60 μM , aproximadamente 70 μM , aproximadamente 80 μM , aproximadamente 90 μM o aproximadamente 100 μM .

En algunas realizaciones, la concentración de dichas una o más celodextrinas C1-oxidadas o sales de las mismas (que puede incluir ácido celobiónico o sal del mismo) (por ejemplo, en una composición (fitofarmacéutica) como se enseña en la presente solicitud) puede ser de 0,10 μM a 1000 μM , tal como de 0,10 μM a 900 μM , de 0,10 μM a 800 μM , de 0,10 μM a 700 μM o de 0,10 μM a 600 μM , preferentemente de 0,10 μM a 500 μM , tal como de 0,10 μM a 400 μM o de 0,10 μM a 300 μM , de manera más preferida de 0,10 μM a 200 μM , de manera incluso más preferida de 0,10 μM a 100 μM , tal como aproximadamente 0,10 μM , aproximadamente 0,50 μM , aproximadamente 1,0 μM , aproximadamente 5,0 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 20 μM , aproximadamente 30 μM , aproximadamente 40 μM , aproximadamente 50 μM , aproximadamente 60 μM , aproximadamente 70 μM , aproximadamente 80 μM , aproximadamente 90 μM o aproximadamente 100 μM .

En algunas realizaciones, la concentración de dichas una o más celodextrinas C4-oxidadas (por ejemplo, en una composición (fitofarmacéutica) como se enseña en la presente solicitud) puede ser de 0,10 μM a 1000 μM , tal como de 0,10 μM a 900 μM , de 0,10 μM a 800 μM , de 0,10 μM a 700 μM o de 0,10 μM a 600 μM , preferentemente de 0,10 μM a 500 μM , tal como de 0,10 μM a 400 μM o de 0,10 μM a 300 μM , de manera más preferida de 0,10 μM a 200 μM , de manera incluso más preferida de 0,10 μM a 100 μM , tal como aproximadamente 0,10 μM , aproximadamente 0,50 μM , aproximadamente 1,0 μM , aproximadamente 5,0 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 20 μM , aproximadamente 30 μM , aproximadamente 40 μM , aproximadamente 50 μM , aproximadamente 60 μM , aproximadamente 70 μM , aproximadamente 80 μM , aproximadamente 90 μM o aproximadamente 100 μM .

En algunas realizaciones, la concentración de dichas una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas (por ejemplo, en una composición (fitofarmacéutica) como se enseña en la presente solicitud) puede ser de 0,10 μM a 1000 μM , tal como de 0,10 μM a 900 μM , de 0,10 μM a 800 μM , de 0,10 μM a 700 μM o de 0,10 μM a 600 μM , preferentemente de 0,10 μM a 500 μM , tal como de 0,10 μM a 400 μM o de 0,10 μM a 300 μM , de manera más preferida de 0,10 μM a 200 μM , de manera incluso más preferida de 0,10 μM a 100 μM , tal como aproximadamente 0,10 μM , aproximadamente 0,50 μM , aproximadamente 1,0 μM , aproximadamente 5,0 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 20 μM , aproximadamente 30 μM , aproximadamente 40 μM , aproximadamente 50 μM , aproximadamente 60 μM , aproximadamente 70 μM , aproximadamente 80 μM , aproximadamente 90 μM o aproximadamente 100 μM .

En algunas realizaciones, la concentración total de las celodextrinas, celodextrinas C1-oxidadas incluyendo el ácido celobiónico, celodextrinas C4-oxidadas y celodextrinas C1 y C4-oxidadas (por ejemplo, en una composición (fitofarmacéutica) como se enseña en la presente solicitud) puede ser de 0,10 μM a 1000 μM , tal como de 0,10 μM a 900 μM , de 0,10 μM a 800 μM , de 0,10 μM a 700 μM o de 0,10 μM a 600 μM , preferentemente de 0,10 μM a 500 μM , tal como de 0,10 μM a 400 μM o de 0,10 μM a 300 μM , de manera más preferida de 0,10 μM a 200 μM , de manera incluso más preferida de 0,10 μM a 100 μM , tal como aproximadamente 0,10 μM , aproximadamente 0,50 μM , aproximadamente 1,0 μM , aproximadamente 5,0 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 20 μM , aproximadamente 30 μM , aproximadamente 40 μM , aproximadamente 50 μM , aproximadamente 60 μM ,

aproximadamente 70 μ M, aproximadamente 80 μ M, aproximadamente 90 μ M o aproximadamente 100 μ M.

Los inventores han descubierto que las combinaciones o mezclas de celodextrinas nativas, celodextrinas C1-oxidadas y celodextrinas C4-oxidadas, y opcionalmente celodextrinas C1 y C4-oxidadas muestran actividad conveniente de elicitor vegetal cuando se incluyen en una variedad grande de proporciones molares relativas.

En algunas realizaciones particularmente preferidas, se observan fuertes efectos elicitores con combinaciones que comprenden relaciones molares de celodextrinas nativas:celodextrinas C1-oxidadas:celodextrinas C4-oxidadas de aproximadamente 4:5:1. En dichas combinaciones las celodextrinas C1 y C4-oxidadas (es decir, doblemente oxidadas) preferentemente no están presentes.

Muchas otras cantidades molares por partes son operables en el presente contexto, tal como, sin limitación aproximadamente 6,5:3:0,5, aproximadamente 3:6,5:0,5, aproximadamente 4:3:3, aproximadamente 4:1:5, aproximadamente 0,5:9:0,5 (relación molar de celodextrinas nativas: celodextrinas C1-oxidadas:celodextrinas C4-oxidadas) o aproximadamente 0,5:4:0,5:5, aproximadamente 2,5:2,5:2,5:2,5 (relación molar de celodextrinas nativas:celodextrinas C1-oxidadas:celodextrinas C4-oxidadas:celodextrinas C1 y C4-oxidadas).

A manera de ejemplos no limitativos adicionales, en una composición que comprende celodextrinas nativas, celodextrinas C1-oxidadas y celodextrinas C4-oxidadas:

0,25 a 9,50 partes molares pueden ser celodextrinas nativas, 0,25 a 9,50 partes molares pueden ser celodextrinas C1-oxidadas y 0,25 a 9,50 partes molares pueden ser celodextrinas C4-oxidadas, con el total siendo 10 partes;

2,50 a 6,00 partes molares pueden ser celodextrinas nativas, 3,50 a 7,00 partes molares pueden ser celodextrinas C1-oxidadas y 0,50 a 3,00 partes molares pueden ser celodextrinas C4-oxidadas, con el total siendo 10,00 partes; o

3,33 partes molares pueden ser celodextrinas nativas, 3,33 partes molares pueden ser celodextrinas C1-oxidadas y 3,33 partes molares pueden ser celodextrinas C4-oxidadas.

A manera de ejemplos no limitativos adicionales, en una composición que comprende celodextrinas nativas, celodextrinas C1-oxidadas, celodextrinas C4-oxidadas y celodextrinas C1 y C4-oxidadas:

0,25 a 9,25 partes molares pueden ser celodextrinas nativas, 0,25 a 9,25 partes molares pueden ser celodextrinas C1-oxidadas, 0,25 a 9,25 partes molares pueden ser celodextrinas C4-oxidadas y 0,25 a 9,25 partes molares pueden ser celodextrinas C1 y C4-oxidadas con el total siendo 10 partes;

2,50 partes molares pueden ser celodextrinas nativas, 2,50 partes molares pueden ser celodextrinas C1-oxidadas, 2,50 partes molares pueden ser celodextrinas C4-oxidadas y 2,50 partes molares pueden ser celodextrinas C1 y C4-oxidadas; o

0,25 a 4,75 partes molares pueden ser celodextrinas nativas, 2,00 a 5,00 partes molares pueden ser celodextrinas C1-oxidadas, 0,25 a 4,75 partes molares pueden ser celodextrinas C4-oxidadas y 3,00 a 6,00 partes molares pueden ser celodextrinas C1 y C4-oxidadas con el total siendo 10 partes.

En algunas realizaciones particularmente preferidas, el ácido celobiónico, las celodextrinas, las celodextrinas C1-oxidadas, las celodextrinas C4-oxidadas y/o las celodextrinas C1 y C4-oxidadas se pueden producir mediante descomposición de la celulosa por una o más polisacárido mono-oxigenasas líticas (LPMO). En algunas realizaciones, la composición, tal como la composición fitofarmacéutica como se enseña en la presente solicitud, puede comprender el producto de descomposición de la celulosa por una o más LPMO, dicho producto de descomposición típicamente comprende una mezcla de celodextrinas nativas, C1-oxidadas y C4-oxidadas, y opcionalmente celodextrinas C1 y C4-oxidadas.

Las polisacárido mono-oxigenasas líticas (LPMO) abarcan ampliamente una clase de enzimas que contienen cobre que catalizan el corte de la celulosa en una manera oxidativa. Estas incluyen LPMO que hidroxilan el C1 (EC 1.14.99.54) lo cual forma fragmentos de celulosa que contienen un residuo D-glucono-1,5-lactona en el extremo reductor, el cual se hidroliza rápida y espontáneamente hasta el ácido aldónico. Estas también incluyen LPMO que deshidrogenan el C4 (EC 1.14.99.56) lo cual forma fragmentos de celulosa que contienen un residuo 4-deshidro-D-glucosa en el extremo no reductor. Estas también incluyen LPMO que hidroxilan el C1/deshidrogenan el C4 (EC 1.14.99.54 y EC 1.14.99.56) lo cual forma fragmentos de celulosa que contienen un residuo 4-deshidro-D-glucosa en el extremo no reductor y el residuo de ácido glucónico en el extremo reductor.

Las LPMO están ampliamente distribuidas a través de los reinos bacteriano y fúngico, y actualmente están clasificadas en siete familias de "actividad auxiliar" (AA) (AA9 – anteriormente familia 61 G hidrolasa (GH), AA10 – anteriormente módulo 33 de unión a carbohidrato (CBM por sus siglas en inglés), AA11, AA13, AA14, AA15 y AA16)

de acuerdo con la base de datos de enzimas activas para carbohidrato (www.cazy.org). La entrada de la base de datos CAZY para la familia AA9 actualmente enlista cerca de 600 números de acceso de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para las LPMO provenientes de microorganismos que incluyen entre otros *Arthrotrrys oligospora*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa* y muchos otros. Aunque se puede utilizar cualquier LPMO apropiada para preparar los compuestos y combinaciones de compuestos elicitores vegetales como se enseña en la presente solicitud, en algunas realizaciones, por lo menos una de dichas una o más LPMO puede pertenecer a la familia 9 de actividad auxiliar (AA). En algunas realizaciones preferidas, por lo menos una de dichas una o más LPMO puede ser de *Botrytis cinerea*, *Thielavia terrestris* o *Myceliophthora thermophila*. El ejemplo de enzimas LPMO de este tipo, incluyendo los números de acceso de GenBank para sus secuencias proteínicas, su aislamiento y realizaciones de su uso en reacciones enzimáticas, se discuten en la sección experimental y será entendido por el experto en la técnica.

En algunas realizaciones, la actividad de LPMO se puede incrementar mediante la inclusión de una o más celobiosa deshidrogenasas (CDH por sus siglas en inglés) en la reacción. Las CDH son enzimas Actividad Auxiliar 3 (EC 1.1.99.18) que catalizan la oxidación de a celobionono-1,5-lactona y también actúa más lentamente en celodextrinas distintas de la celobiosa.

La entrada de la base de datos CAZY para la familia AA3 actualmente incluye más de 1300 números de acceso del GenBank para CDH de muchas fuentes diferentes. En algunas realizaciones preferidas, la CDH puede ser de *Botrytis cinerea* o *Myceliophthora thermophila*. Las secuencias proteínicas de ejemplo de dichas enzimas incluyen aquellas anotadas bajo el número de acceso del GenBank AF074951.1 (ARNm de la celobiosa deshidrogenasa (cdh) de *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464, cds completa). Dichas proteínas se pueden aislar, por ejemplo, a partir de fuentes de microorganismos que las expresen endógenamente o se pueden producir mediante expresión recombinante como se sabe en la técnica. Las enzimas LPMO y las mezclas de enzimas también están disponibles comercialmente (NZYTech, Lisabon, Portugal, LPMO-AA9 código de producto CZ0959, "celulosa mono-oxigenasa lítica 9B" de *Geotrichum candidum*; Novozymes, Bagsværd, Dinamarca, productos Cellic® CTec 2 y Cellic® CTec 3).

En algunas realizaciones, la celulosa sobre la que actúan la(s) enzima(s) LPMO y opcionalmente la(s) enzima(s) CDH puede ser de desperdicio lignocelulósico o de papel para pulpa. Lignocelulosa o biomasa lignocelulósica se refiere a biomasa vegetal, constituida principalmente por polímeros de carbohidrato que incluyen principalmente celulosa y hemicelulosa, y el polímero aromático lignina. La biomasa lignocelulósica es una materia prima abundante y es utilizada por ejemplo en aplicaciones de biorrefinería para producir biocombustibles, tal como principalmente bioetanol. Otro uso común de la biomasa lignocelulósica es en la producción de pulpa de madera y papel. Por consiguiente, el desperdicio lignocelulósico o papel para pulpa representan fuentes convenientemente abundantes de celulosa.

En algunas realizaciones, el desperdicio lignocelulósico puede ser subproductos lignocelulósicos de aplicaciones de biorrefinería. Comúnmente, la producción de biocombustibles implica la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica utilizando cocteles que contienen LPMO para descomponer la celulosa para fermentación corriente abajo. Por consiguiente, el producto de biodesperdicio de dichas biorrefinerías ya contiene una cierta cantidad de ácido celobiónico y/o de celodextrinas y celodextrinas oxidadas (por ejemplo, aproximadamente 1-3 % p/v de ácidos aldónicos tal como ácido celobiónico), que se puede utilizar como se enseña en la presente solicitud, opcionalmente (pero no necesariamente) subsiguiente a algún proceso de aislamiento o purificación a partir del biodesperdicio.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la composición (fitofarmacéutica) como se enseña en la presente solicitud se puede preparar a partir de subproductos lignocelulósicos de biorrefinería tratados con LPMO, o puede comprender o consistir esencialmente en subproductos lignocelulósicos de biorrefinería tratados con LPMO.

En realizaciones adicionales, se pueden combinar uno o más elicitores de defensa vegetal adicionales con los elicitores de defensa vegetal novedosos como se enseña en la presente solicitud. Por consiguiente, también se contemplan tratamientos de combinación. La administración de los distintos elicitores a las plantas puede ser simultánea o secuencial en cualquier orden, y estos pueden estar comprendidos en la misma composición (por ejemplo, mezclados) o se pueden proveer en una forma físicamente separada, por ejemplo, en diferentes viales o paquetes, formando opcionalmente un kit de partes.

En algunas realizaciones, dichos uno o más elicitores de defensa vegetal adicionales se pueden seleccionar a partir de compuestos derivados de la pared celular de plantas u hongos. En algunas realizaciones preferidas, dichos uno o más elicitores de defensa vegetal adicionales se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en fragmentos de pectina, oligogalacturónidos, celobiosa, xiloglucano, β -1,3-glucano no ramificado, fragmentos de quitina, arabinosa, arabinano, ramnosa, homogalacturonano, ramnogalacturonano I y II, xilogalacturonano, almidón y combinaciones de los mismos.

Los compuestos y las combinaciones de o composición que comprende los compuestos como se enseña en la presente solicitud, se utilizan de acuerdo con la presente descripción como elicitores de defensa contra patógenos vegetales. Este término abarca ampliamente cualesquiera compuestos o composiciones que sean capaces de

inducir las defensas vegetales naturales, de activar las reacciones de defensa y resistencia vegetal contra patógenos vegetales, de estimular la producción de moléculas de defensa vegetal contra patógenos vegetales y/o de prevenir, controlar o tratar una planta contra infección por un patógeno vegetal, cuando se administran a una planta, semilla de la planta o a un órgano de una planta. Por consiguiente, cuando es percibido por una planta, un elicitor puede

5 provocar reacciones defensivas moleculares, bioquímicas y/o fisiológicas de la célula vegetal, tal como la síntesis, o incremento de la síntesis, de molécula(s) de defensa vegetal, por ejemplo etileno y/o ácido salicílico y jasmónico, la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) y/o la expresión de genes y proteínas relacionadas con la defensa específicos, por ejemplo proteínas inhibidoras de poligalacturonasa (PGIP por sus siglas en inglés). La activación de la(s) ruta(s) de transducción de señal puede llevar en forma subsiguiente a la expresión de genes de

10 defensa de larga duración y a la producción de metabolitos secundarios. Como resultado, un elicitor de defensa contra patógenos vegetales puede mejorar la capacidad de la planta de resistir o luchar contra un patógeno dado. Los elicitores de defensa vegetal con frecuencia son subsumidos por el grupo de agentes coloquialmente conocidos como bioplaguicidas, que incluye principalmente bioinsecticidas, biofungicidas, bionematicidas y otros.

15 Por lo tanto, en algunas realizaciones, por medio de los presentes compuestos o composiciones, se puede prevenir, controlar o tratar una infección vegetal por un patógeno vegetal. Aunque algunos de estos términos son bien conocidos como tal, a manera de guía adicional, "prevenir" puede significar en particular evitar la aparición de por lo menos un efecto o síntoma adverso, preferentemente todos los efectos o síntomas adversos inducidos por infección por un patógeno vegetal; "controlar" puede significar en particular detener el avance de una infección por patógeno

20 vegetal, de manera más precisa reducir o eliminar la diseminación del patógeno vegetal a través de las partes sanas de una planta o de un órgano de una planta o de una planta infectada a otra planta, típicamente a una planta vecina; y "tratar" puede significar en particular aliviar el o los síntomas de una infección o curar completamente una infección, típicamente reduciendo o eliminando completamente un fitopatógeno (típicamente un hongo o una bacteria), es decir, eliminando cualquier fitopatógeno viable en la planta o en un órgano o varios órganos o cada

25 órgano(s) de la planta.

Una planta se puede poner en contacto con una cantidad efectiva de los presentes compuestos o composiciones, tal como poner en contacto a través de un órgano de la planta, preferentemente un órgano que se selecciona a partir de hojas, raíces y/o frutos, o a través de las semillas de la planta. La etapa de poner en contacto se puede realizar una

30 vez o varias veces (por ejemplo, de manera regular o periódica, por ejemplo, en la temporada apropiada o en la etapa del desarrollo vegetal apropiada). La expresión "una cantidad efectiva" se refiere a una cantidad del compuesto o compuestos (activo(s)) como se enseña en la presente solicitud que induce o provoca las defensas naturales de la planta, activa la reacción de defensa y resistencia de la planta contra patógenos vegetales y/o estimula la producción de moléculas de las defensas de la planta contra patógenos vegetales que da como resultado

35 la obtención de una planta resistente al o los patógenos. Se entiende que la cantidad efectiva es variable, ya que esta puede ser afectada por muchos factores, incluyendo, pero sin limitarse al tipo de planta tratada, dosificaciones de tratamiento y tasas de aplicación, método de poner en contacto, condiciones climáticas y estacionales experimentadas durante el ciclo de crecimiento de la planta, susceptibilidad a patógenos, etc. Dichas variables son comúnmente encontradas y entendidas por el experto en la técnica, quien podría ajustar el régimen profiláctico o de

40 tratamiento, por ejemplo, tasa de aplicación, tiempos o frecuencias de aplicación, y forma de aplicación. Los intervalos de cantidades o concentraciones apropiadas particulares se discuten y ejemplifican en otra parte en esta descripción. Los términos y expresiones "órgano", "órgano de una planta" u "órgano de la planta" se refieren de manera intercambiable a una parte de una planta o a un material de propagación de la planta. Los ejemplos de órganos de la planta incluyen, pero no se limitan a, hojas, tallos, frutos, semillas, cortes, tubérculos, raíces, bulbos, rizomas y similares. La etapa de poner en contacto con la planta u órganos se puede realizar en diversas maneras,

45 por ejemplo, mediante aspersión, empapado, remojo, inmersión, inyección, a través de la alimentación del suelo y cualquier combinación de las mismas. De manera alternativa, los compuestos o composiciones se pueden aplicar en una planta u órgano suministrando una forma volátil o basada en vapor de los compuestos o composiciones en la vecindad del tejido vegetal y permitiendo la difusión a la planta u órgano a través de la atmósfera. El experto en la

50 técnica sabe cómo adaptar la manera de administración al uso particular.

En el contexto de la presente invención, el término "planta" típicamente designa una planta infectada por o que presenta una susceptibilidad a infección por un patógeno vegetal. Por ejemplo, la planta puede pertenecer al clado de las *Angiospermas*.

55 En algunas realizaciones, la planta puede pertenecer al clado de las dicotiledóneas. Los ejemplos de plantas del clado de las dicotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, la familia *Solanaceae*, que comprende *Solanum lycopersicum* (tomate), *Solanum tuberosum* (papa), *Solanum melongena* (berenjena), género *Capsicum* (chile) y *Nicotiana tabacum* (tabaco); la familia *Vitaceae* que comprende el género *Vitis* (vides); la familia *Brassicaceae*, que comprende *Brassica oleracea* (col), *Brassica rapa* (nabo y col china), especies de mostaza y *Arabidopsis thaliana*; la

60 familia *Rosaceae*, que comprende *Malus pumila* (manzan), especies *Pyrus* (pera) y *Fragaria ananassa* (fresa); la familia *Fabaceae* que comprende leguminosas tal como chícharo, frijol y soja; la familia *Asteraceae*, que comprende girasol; familia *Amaranthaceae*, que comprende remolacha azucarera.

65 En algunas realizaciones, la planta puede pertenecer al clado de las monocotiledóneas. Un ejemplo de plantas del clado monocotiledóneas incluye, pero no se limita a, la familia *Gramineae* o *Poaceae*, tal como maíz, arroz, cebada o

trigo.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la planta puede ser una planta dicotiledónea, que preferentemente se selecciona a partir de las familias *Brassicaceae*, *Solanaceae* o *Rosaceae*, tal como *Arabidopsis thaliana*, col, tomate, vid, soja, manzana, pera o fresas, o en las cuales la planta es una planta monocotiledónea, que preferentemente se selecciona a partir de la familia *Gramineae*, tal como maíz, arroz, cebada o trigo.

En realizaciones preferidas, el patógeno vegetal puede ser un hongo o una bacteria. Por consiguiente, en tal caso las composiciones como se enseña en la presente solicitud también se pueden denotar de manera conveniente como adyuvantes antifúngicos y/o un antibacteriano, es decir, productos que ayudan en la prevención o tratamiento de una enfermedad vegetal típicamente causada por hongos o bacterias.

En algunas realizaciones, el patógeno puede ser un hongo o bacteria necrotrófico, un hongo o bacteria hemibiotrófico, o un hongo o bacteria biotrófico.

Durante la colonización de los hospederos vegetales, la mayoría de los patógenos fúngicos exhiben uno de dos modos de nutrición: biotrofia, en el cual los nutrientes son obtenidos a partir de células hospedadoras vivas y necrotrófia, en el cual los nutrientes son obtenidos a partir de células hospedadoras que han sido previamente aniquiladas por el hongo. Un tercer modo de nutrición es la hemibiotrofia, en la cual el patógeno tiene un periodo inicial de biotrofia seguido por un periodo de necrotrófia. Los patógenos fitopatogénicos, en particular los hongos, pueden por lo tanto distinguirse dependiendo de su modo de nutrición: necrotróficos (por ejemplo, *Botrytis cinerea*), biotróficos (por ejemplo, *Ustilago maydis*) o hemibiotróficos (por ejemplo, *Colletotrichum higginsianum*).

En realizaciones particularmente preferidas, el patógeno vegetal puede ser un hongo, típicamente un hongo fitopatógeno. La expresión "hongo fitopatógeno" se refiere a patógenos fúngicos que infectan los órganos vegetales. Los ejemplos de hongos fitopatógenos incluyen, pero no se limitan a, hongos que pertenecen a las clases *Ascomycetes* y *Basidiomycetes*, tal como, por ejemplo, hongos del orden de los *Helotiales*, tal como, por ejemplo, la familia *Sclerotiniaceae*, *Botrytis/Botryotinia*, tal como la especie *Botrytis cinerea*; hongos del orden de los *Hypocreales*, tal como, por ejemplo, la familia *Nectriaceae*, género *Fusarium*; hongos del orden de los *Uredinales*, tal como, por ejemplo, la familia *Pucciniaceae*, género *Puccinia*; hongos del orden de los *Ustilaginales*, tal como, por ejemplo, la familia *Ustilaginaceae*, género *Ustilago*; hongos del orden de los *Sordariomycetes*, tal como, por ejemplo, la familia *Glomerellaceae*, género *Colletotrichum*.

En realizaciones adicionales, el patógeno vegetal puede ser una bacteria, típicamente una bacteria fitopatógena. La expresión "bacteria fitopatógena" se refiere a patógenos bacterianos que infectan los órganos vegetales. Los ejemplos de bacterias fitopatógenas incluyen, pero no se limitan a, bacterias del orden de los *Pseudomonadales*, tal como, por ejemplo, la familia *Pseudomonadaceae*, género *Pseudomonas*, tal como la especie *Pseudomonas syringae*; bacterias del orden de los *Burkholderiales*, tal como, por ejemplo, la familia *Burkholderiaceae*, género *Ralstonia*, tal como la especie *Ralstonia solanacearum*; bacterias del orden de los *Enterobacterales*, tal como, por ejemplo, la familia *Erwiniaceae*, género *Erwinia*, tal como la especie *Erwinia amylovora*, o la familia *Pectobacteriaceae*, género *Pectobacterium*, tal como la especie *Pectobacterium carotovorum* (anteriormente *Erwinia carotovora*); bacterias del orden de los *Xanthomonadales*, tal como, por ejemplo, la familia *Xanthomonadaceae*, género *Xylella*, tal como la especie *Xylella fastidiosa* o el género *Xanthomonas*, tal como la especie *Xanthomonas campestris*. De manera similar a los hongos y tomando como base el tipo de colonización vegetal, las bacterias también se pueden clasificar en las subclases necrotróficas, biotróficas y hemibiotróficas.

Los hongos necrotróficos pueden ser particularmente preferidos, preferentemente como *Botrytis cinerea*. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el patógeno vegetal es un hongo o una bacteria, tal como un hongo o bacteria necrotrófica, tal como *Botrytis cinerea*, un hongo o bacteria hemibiotrófica, o un hongo o bacteria biotrófica, tal como *Pseudomonas syringae*.

En el presente contexto, la infección vegetal por un patógeno vegetal típicamente designa una infección vegetal por lo menos por un fitopatógeno. La infección puede ocurrir en cualquier órgano de la planta. A manera de ejemplos y sin limitación, la infección vegetal puede ser, por ejemplo, una infección por *B. cinerea*, por ejemplo una infección por *B. cinerea* de *A. thaliana*, tomate, fresa, girasol, vid o manzana; una infección por *C. higginsianum*, por ejemplo una infección por *C. higginsianum* de nabo, col china, mostaza, *A. thaliana* o manzana; una infección por *U. maydis*, por ejemplo una infección por *U. maydis* de maíz; una infección por *R. solanacearum*, por ejemplo una infección por *R. solanacearum* de tomate, papa, berenjena, chile o tabaco; una infección por *Pseudomonas syringae*, por ejemplo una infección por *Pseudomonas syringae* en manzana o pera; o cualquier combinación de las mismas, tal como una infección por *B. cinerea* y/o *C. higginsianum* de *A. thaliana*, una infección de la manzana por *B. cinerea* y/o *C. higginsianum* o una infección del tomate por *B. cinerea* y/o *R. solanacearum*.

Los aspectos y realizaciones de la invención descritos en la presente solicitud están apoyados adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Materiales y métodos utilizados en el Ejemplo 2**Material vegetal e inoculación fúngica**

Arabidopsis thaliana Columbia (Col-0) es el código de acceso utilizado para todos los experimentos. Las semillas se someten a esterilización de superficie mediante tratamiento subsiguiente con Et-OH al 50 % v/v y solución de blanqueador al 3 % en agitación durante 5 y 10 minutos, respectivamente. Las semillas después se lavan tres veces con agua destilada y se estratifican durante 3 días a 4 °C en la oscuridad. Para el análisis de qPCR y los experimentos en microarreglo, las semillas se siembran en cajas de Petri cuadradas (13 x 13 mm) que contienen sales de Murashige y Skoog (MS) a media concentración, MES 2,5 mM, sacarosa al 1 % p/v y agar vegetal al 0,8 % p/v. Los experimentos se efectúan utilizando plántulas de 14 días de edad crecidas verticalmente en un gabinete de crecimiento controlado con condiciones de día corto (8/16 horas de luz/oscuridad; fotones 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a $22 \pm 0,5$ °C. Los tratamientos se efectúan aplicando 40-50 μl de solución recién preparada y filtrada por cada plántula.

Para el análisis de crecimiento "*in planta*" de *Botrytis cinerea* y las pruebas histoquímicas, se germinan plantas *Col-0* de cinco semanas de edad en tierra y se crecen en cámara controlada (8/16 horas de luz/oscuridad a 22/20 °C día/noche) con una humedad relativa igual a 70 %. Los tratamientos se efectúan aplicando 40-50 μl de solución recién preparada y filtrada por hoja.

Botrytis cinerea (cepa B05.10, del Instituto INRA/IJPB, Versailles, Francia) se hace crecer en medio de agar-papa-dextrosa a 21 °C, con un fotoperiodo de 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad. Las hojas se inoculan con dos gotitas de 5- μL de esporas de *B. cinerea* (5×10^5 esporas ml^{-1}). En los puntos de tiempo indicados, se extrae ADN genómico a partir de hojas enteras siguiendo el protocolo modificado de Edwards *et al.* ("A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis". *Nucl. Acid. Res.* 1991, vol. 19, 1349-1991) y la biomasa fúngica se cuantifica como se describe en Gachon y Saindrenan ("Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*". *Plant Physiol Biochem.* 2004, vol. 42, 367-371).

Extracción de ARN, preparación de ADNc y análisis de qPCR

Para la extracción de ARN, se recolectan hojas de 14 días de edad a partir de diez plantas independientes en el punto de tiempo indicado después de los tratamientos, se combinan y se congelan en nitrógeno líquido. El ARN total se extrae a partir de 100 mg de muestras molidas en estado congelado utilizando el kit para ARN vegetal Maxwell® LEV (Promega, Madison, WI, E.U.A.) y se determina la integridad del ARN a través de un espectrofotómetro de UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Loughborough, Reino Unido). La primera cadena de ADNc se sintetiza utilizando la mezcla para síntesis de ADNc Rt SOLIScript® (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) y las qPCR se efectúan utilizando la mezcla maestra SYBR® Selected 2x (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, E.U.A.), siguiendo los protocolos del fabricante. Las condiciones de ciclado consisten en unos 7 minutos iniciales a 95°C, seguido por 40 ciclos de dos etapas a 95 °C durante 5 segundos y a 60 °C durante 30 segundos. Se efectúa análisis de la curva de fusión después de la finalización del ciclo para validar la identidad de amplicón. Los niveles de expresión relativa se calculan siguiendo el método basado en curva patrón (Larionov *et al.*, "A standard curve based method for relative real time PCR data processing", *BMC Bioinformatics.* 2005, vol. 6, 1) utilizando *ACTIN* como referencia. Los iniciadores específicos de gen utilizados en este trabajo se indican más adelante.

Hibridación en microarreglo y análisis de datos

La preparación de la muestra de ARN para hibridación en microarreglo se lleva a cabo como se describe en la guía de usuario del kit de reactivo GeneChip™ Whole Transcript (WT) PLUS de Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, E.U.A.). Brevemente, se utilizan 200 ng de ARN total para generar ADNc de doble cadena. Doce μg de ARNc sintetizados posteriormente se purifican y se someten a transcripción inversa hasta ADNc de cadena individual ((ss)cDNA por sus siglas en inglés), en el cual se incorporan residuos dUTP no natural. Los sscDNA purificados y marcados se hibridan en arreglos 1.0 ST para gen de *Arabidopsis* (Affymetrix, Santa Clara, CA, E.U.A.) y las señales fluorescentes se miden con un sistema de escáner GeneChip 3000 7G de Applied Biosystems™. El procesamiento de las muestras se efectúa en una Instalación del Centro de Genómica, "KFB – Centro de Excelencia para Bioanalítica Fluorescente" (Regensburg, Alemania).

Las señales del conjunto de sondas normalizadas en escala $\log_2$ se calculan utilizando el algoritmo RMA. Se generan agrupamientos jerárquicos de enlazamiento promedio de genes expresados de manera diferencial utilizando el software Cluster 3.0 y visualizado mediante java TreeView.

Ontología de gen y análisis de enriquecimiento de ruta

Se efectúa análisis de ontología de gen relacionado con el proceso biológico para el análisis Cytoscape en genes activados y reprimidos (cambio en número de veces de $\log_2 >1,5$ o $<-1,5$, valor de *p* de la prueba de la *t* de Student $<0,05$) mediante el software gProfiler utilizando FDR de Benjamini y Hochberg ($<0,05$) como etapa de filtración y

utilizando solamente genes anotados de acuerdo con Reimand *et al.*, ("Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap". *Nat Protoc.* 14:482-517. 2019).

Tinción de callosa

La cuantificación de los depósitos de callosa se efectúa esencialmente como se describe en Zarattini *et al.*, ("The bile acid deoxycholate elicits defences in *Arabidopsis* and reduces bacterial infection". *Mol Plant Pathol.* 2017, vol. 18(4), 540-554). Brevemente, se tiñen hojas de 5 semanas de edad de *Arabidopsis* utilizando azul de anilina 0,01 % p/v en 150 mm de solución amortiguadora de K_2HPO_4 (pH 9,5) durante 30 minutos y después se destiñe en una solución de aclaramiento de lactofenol durante toda la noche. Las hojas se examinan mediante microscopía de estereofluorescencia con un Azio Zoom V.16 (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Alemania) y se cuantifican las manchas de callosa utilizando el software ImageJ.

Pruebas de detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Se analiza el peróxido de hidrógeno en plantas de *Arabidopsis* crecidas tanto *in vitro* como en tierra. La detección *in situ* de H_2O_2 se efectúa siguiendo el protocolo descrito por Daudi y O'Brien ("Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves". *Bio Protoc.* 2012, vol. 2(18), e263). Brevemente, se tratan hojas de plantas *Col-O* de 5 semanas de edad con gotitas (gotas de 40 – 50 μ l por hoja) con los compuestos indicados. A las 24 horas después del tratamiento se infiltran suavemente al vacío cuatro hojas en roseta provenientes de cinco plantas independientes (5 minutos) con 1 mg ml^{-1} de 3,3'-diaminobencidina (DAB) disuelta en solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM y Tween 80 al 0,05 % v/v. La reacción de tinción se termina 5 horas después de infiltración con DAB y las hojas se fijan en etanol:glicerol:ácido acético 3:1:1. La clorofila se elimina mediante varias etapas de lavado con etanol al 70 % v/v y se toman fotografías con un estereomicroscopio (Discovery V8, Zeiss).

También se detecta el H_2O_2 inducido por elicitador mediante una prueba basada en luminol-peroxidasa como se describe en Albert *et al.*, ("Chemiluminescence Detection of the Oxidative Burst in Plant Leaf Pieces". *Bio-protocol* 2015, vol. 5(6), e1423). Brevemente, veinte hojas provenientes de 10 plantas *Col-O* independientes de 4-5 semanas de edad se cortan y se incuban en ddH₂O durante toda la noche. Se evalúa la luminiscencia con el curso del tiempo utilizando la lectora de microplaca de modos múltiples SpectraMax iD3 (Molecular devices, San Jose, CA, E.U.A.) con un tiempo de integración por cavidad = 1000 ms.

Prueba de detección de superóxido (O_2^-)

El anión superóxido se analiza efectuando la prueba de nitroazul de tetrazolio (NBT). Brevemente, *Col-O* de 5 semanas de edad se trata con gotas minúsculas con el compuesto indicado. A las 24 horas después del tratamiento, se cortan cuatro hojas provenientes de cinco plantas y se colocan en tubos que contienen la solución de NBT (3,5 mg ml^{-1} de NBT, solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5) y se someten a infiltración al vacío durante 5 minutos. Después, las hojas se incuban bajo condiciones de oscuridad durante toda la noche. La clorofila se elimina mediante varias etapas de lavado con etanol al 70 % v/v y se toman fotografías con un estereomicroscopio (Discovery V8, Zeiss).

Clonación, expresión y caracterización de oligosacárido de AA9

Se clonan varias enzimas de la familia de actividad auxiliar (AA) 9 (AA9) de polisacárido mono-oxigenasa lítica (LPMO), para producir diversos celo-oligosacáridos producidos por AA9 (AA9_COS), para utilizarse como elicitores. Los ejemplos particularmente activos incluyen: TtAA9E proveniente de *Thielavia terrestris* (ACE10234.1) obtenido sintéticamente de Eurofins Genomic (Ebersberg, Alemania), secuencia de gen ATG TTA GCT AAT GGT GCA ATC GTT TTC CTT GCT GCC GCC TTG GGT GTG TCC GGA CAT TAC ACC TGG CCA CGT GTC AAT GAC GGT GCC GAC TGG CAG CAG GTA AGG AAG GCC GAT AAT TGG CAG GAT AAC GGT TAC GTT GGT GAT GTG ACG TCA CCA CAA ATC AGG TGC TTT CAA GCT ACC CCA AGT CCT GCT CCA AGT GTA CTT AAT ACT ACA GCT GGC TCT ACC GTC ACT TAC TGG GCC AAC CCA GAT GTG TAT CAT CCA GGT CCT GTT CAA TTT TAC ATG GCT AGG GTG CCT GAC GGC GAA GAT ATT AAC TCA TGG AAC GGT GAC GGA GCT GTT TGG TTC AAA GTC TAC GAA GAT CAT CCT ACT TTC GGT GCC CAA TTG ACA TGG CCT TCC ACT GGT AAG AGT TCT TTT GCT GTA CCC ATT CCA CCA TGC ATC AAA AGT GGA TAT TAT CTA TTG AGA GCC GAA CAG ATT GGA TTG CAT GTG GCT CAG AGT GTT GGA GGA GCT CAA TTC TAT ATT TCC TGC GCC CAA TTA TCT GTT ACT GGA GGA GGA TCA ACC GAA CCA CCC AAT AAG GTT GCA TTC CCC GGA GCT TAT TCC GCC ACT GAT CCA GGT ATT CTT ATT AAT ATT TAT TAT CCT GTG CCT ACG TCC TAT CAA AAT CCT GGA CCA GCT GTA TTT TCT TGC (SEQ ID NO: 1). El gen sintético se clona en un pPICZ α -A que contiene el promotor inducido por metanol AOX1, la señal de secreción del factor α , el epítopo c-myc C-terminal y la etiqueta polihistidina (6His-Tag). Los plásmidos resultantes (~10 μ g de pPICZT::lpmo) se insertan mediante transformación en *P. pastoris* X-33. Las células competentes se preparan de la siguiente manera: células de levadura provenientes de 100 ml de medio YPD (1 % (p/v) de extracto de levadura, 2 % (p/v) de peptona y 2 % (p/v) de dextrosa) se hacen crecer hasta una DO₆₀₀ de 1 a 2 y se sedimentan mediante centrifugación a 1500 xg durante 5 minutos. Las células después se lavan dos veces con agua y se suspenden a temperatura ambiente durante 30 minutos en 8 ml de LiCl 0,1 M y DTT 10 mM, sorbitol 0,6 M y Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Las células después se sedimentan y se vuelven a suspender en sorbitol 1

M hasta una concentración final de aproximadamente 10^{10} células/ml. El método de transformación se efectúa como es descrito por Invitrogen. Las colonias de *P. pastoris* transformadas se hacen crecer y se seleccionan en medio YPDS (1 % (p/v) de extracto de levadura, 2 % (p/v) de peptona, 2 % (p/v) de dextrosa, sorbitol 1 M y 2 % (p/v) de agar) que contiene 0,2 mg/ml de zeocina a 30 °C durante 3 días (S. Wu, G. J. Letchworth, "High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol", *Biotechniques*. 36:2004, 152–154, doi.org/10.2144/04361dd02). La expresión de proteína se efectúa de la siguiente manera: los transformantes resistentes a zeocina aislados se someten a una selección en YPD que contiene 0,2 mg/ml de zeocina y se incuban a 30 °C y 200 rpm durante 16 horas. Se inoculan 50 µl de precultivo de YPD en 5 ml de BMGY el cual contiene glicerol como una fuente de carbono (1 % de extracto de levadura, 2 % (p/v) de peptona, 1,34 % (p/v) de YNB, 4×10^{-5} % de biotina, fosfato de potasio 0,1 M (pH 6,0) y 1 % (p/v) de glicerol) y después se incuban a las mismas condiciones durante 16 horas. Las células se sedimentan y se suspenden en 1 ml de BMMY, el cual contiene metanol para inducir la expresión de proteína y también se utiliza como una fuente de carbono (1 % (p/v) de extracto de levadura, 2 % (p/v) de peptona, 1,34 % (p/v) de YNB, 4×10^{-5} % de biotina, fosfato de potasio 0,1 M (pH 6,0) y 1 % (v/v) de metanol). Después el medio de cultivo se suplementa diariamente con metanol al 2 % (v/v) durante 3 días. La expresión de enzimas se confirma mediante análisis SDS-PAGE del contenido de sobrenadante (M. Haon, S. Grisel, D. Navarro, A. Gruet, J.G. Berrin, C. Bignon, "Recombinant protein production facility for fungal biomass-degrading enzymes using the yeast *Pichia pastoris*", *Front Microbiol.* 6:2015, 1002, doi.org/10.3389/fmicb.2015.01002).

Además, un segundo ejemplo de LPMO activa utilizado es el gen *MtAA9A* (MYCTH_112089) *Thermothelomyces thermophilus* M77 (anteriormente *Myceliophthora thermophila*), obtenido del Centro de Acervo Genético de Hongos (Universidad de Missouri, Kansas City, Missouri), amplificado mediante PCR a partir de ADN genómico con el péptido señal original. El producto de PCR se amplifica utilizando los iniciadores de oligonucleótido sentido (5'-AGCATCATTACACCTCAGCAATGAAGTCCTTCACCCTCAC-3'; SEQ ID NO: 2) y antisentido (5'-TAAATCACTAGATATCTCTATTAGACGCACTGCGAGTAGT-3'; SEQ ID NO: 3) y se clona en el vector pEXPYR (Kadowaki *et al.*, "Functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*". *PlosOne* 2018, vol. 13, e0202148) utilizando el protocolo de clonación independiente de ligación (LIC por sus siglas en inglés). El clon se transforma en *A. nidulans* A773, como se describe (Segato *et al.*, "High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*". *Enzyme Microb. Technol.* 2012, vol. 51, 100–106). Se inoculan aproximadamente 10^7 esporas ml⁻¹ en medio líquido mínimo a pH 6,5, que contiene 50 ml/l de sales de Clutterbuck (120 g/l de NaNO₃, 10,4 g/l de KCl, 10,4 g/l de MgSO₄·7H₂O y 30,4 g/l de KH₂PO₄), 1 ml/l de elementos traza (22 g/l de ZnSO₄·7H₂O, 11 g/l de H₃BO₃, 5 g/l de MnCl₂·4H₂O, 5 g/l de FeSO₄·7H₂O, 1,6 g/l de CoCl₂·5H₂O, 1,6 g/l de CuSO₄·5H₂O, 1,1 g/l de Na₂MoO₄·4H₂O y 50 g/l de Na₂EDTA), suplementado con 1 mg/L de piridoxina y 2 % (p/v) de maltosa y se mantienen en cultivo estático a 37 °C durante 48 horas. El medio de cultivo se filtra utilizando membrana Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, E.U.A.).

Para todas las proteínas secretadas se utilizan las mismas siguientes etapas para su separación y purificación. Las proteínas se concentran 10 veces mediante el concentrador de flujo cruzado tangencial VivaFlow 200 (valor de corte de masa molecular, 10 kDa; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania) e inmediatamente se aplican a una columna de DEAE-Sefarosa de 10 ml (GE Healthcare) pre-equilibrada con solución amortiguadora de Tris/HCl 20 mM pH 8,0. La enzima se recolecta en la fracción de flujo pasante y se concentra mediante ultrafiltración (valor de corte 10 kDa Centricon-Millipore, Billerica, MA, E.U.A.). La *MtAA9A* se satura con cobre incubando la solución de proteína en Tris-HCl 50 mM pH 8,0 con un exceso molar de 3 veces de Cu(II)SO₄ durante 10 minutos a temperatura ambiente y se purifica adicionalmente utilizando cromatografía por exclusión de tamaño en una columna Sephadex 75 HiLoad 16/60 (GE Healthcare) con una solución amortiguadora para corrida que consiste en NaCl 150 mM y Tris-HCl 20 mM pH 8,0. La proteína total se cuantifica utilizando el método de Bradford (Bradford. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Anal. Biochem.* 1976, vol. 72, 248–254). La pureza de la proteína se analiza mediante SDS-PAGE, teñida con azul de Coomassie G-250. El sustrato celulósico celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC) se prepara de la siguiente manera: 4 gramos de celulosa Avicel (Sigma Aldrich Saint-Luis) se suspenden en ácido fosfórico, 100 ml (86 % p/v) a temperatura ambiente y se agitan durante una hora. Después, la mezcla se lava varias veces con 20 litros de agua helada para eliminar el H₃PO₄ antes de agregar solución de NaHCO₃ al 1 % para neutralizar cualquier H₃PO₄ residual. La materia seca final se analiza en un analizador de humedad MA45 (Sartorius, Alemania), la preparación se realiza siguiendo el procedimiento estándar descrito por Wood ("Preparation of Crystalline, Amorphous, and Dyed Cellulase Substrates". *Methods Enzymol.* 1988, vol. 160, 19–25). La PASC (0,5 %, p/v) se incuba con dicha *MtAA9A* 1 µM en solución amortiguadora de acetato de sodio 20mM (pH 5,0) utilizando ácido ascórbico 1mM como agente reductor en un volumen final de 10 ml. La reacción se incuba a 50 °C y agitación a 800 rpm durante 16 horas. La reacción después se centrifuga a 13.000 x g durante 3 minutos y el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo. Se inserta una muestra de 60 µl en el vial cónico para HPLC y se analizan los productos de reacción de LPMO mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto desempeño (HPAEC) en un instrumento Dionex ICS6000 equipado con detección de amperometría pulsada (PAD) y una columna CarboPac PA1 (2 x 250 mm) con una columna de protección CarboPac PA1 (2 x 50 mm). La elución se efectúa como se describe en Westereng *et al.*, ("Efficient separation of oxidized cello-oligosaccharides generated by cellulose degrading lytic polysaccharide monooxygenases". *J Chromatogr A.* 2013, vol. 1271, 144–152). Los picos de los oligómeros de celulosa en los cromatogramas se asignan de acuerdo con Westereng *et al.*, 2013 (*supra*).

Prueba de digestión enzimática con beta-glucosidasas

Las celodextrinas nativas celobiosa, celotriosa y celotetraosa a 100 μ M cada una, y ácido celobiónico, ácido celotriónico y ácido celotetraónico C1-oxidados a 100 μ M cada uno, y la mezcla de AA9_COS (100 μ M) se incuban todos individualmente con enzimas beta-glucosidasas 1 μ M provenientes de *Aspergillus niger* (Megazymes, Irlanda, código de producto: E-BGLUC) durante 1 hora a 50 grados Celsius, utilizando solución amortiguadora de acetato de Na 50 mM a pH 5,5. El volumen de reacción se configura a 500 μ l y se lleva a tubos de 2 ml herméticos al gas, se agitan constantemente a 800 rpm, y se muestrean 100 μ l de la hidrólisis después de 5 minutos, 30 minutos y 60 minutos. Los hidrolizados se analizan mediante analítica de HPAEC de acuerdo con Westereng et al. 2013 (*vide supra*).

Ejemplo 2: Las celodextrinas oxidadas y las mezclas de celodextrinas oxidadas y nativas actúan como potentes elicitores de la defensa vegetal

En este ejemplo, los miembros de la familia de LPMO AA9, a saber, TtAA9E y MtAA9A se clonan a partir de los hongos *Thielavia terrestris* y *Myceliophthora thermophila*, respectivamente, y se demuestra y se caracteriza por vez primera el producto de su actividad sobre el sustrato de celulosa como elicitador de la defensa vegetal. Para entender el impacto de los celo-oligosacáridos derivados de LPMO (de aquí en lo sucesivo denominados AA9_COS) en plantas, se lleva a cabo análisis de genoma completo en plántulas de *Arabidopsis*. El análisis de respuestas transcripcionales tempranas muestra una modulación poderosa del sistema inmunitario de la planta. Además, los componentes individuales, en particular el ácido celobiónico, ácido celotriónico y celobiosa se separan para caracterizar los efectos específicos de las celodextrinas oxidadas y nativas de las mezclas de AA9_COS. Se observan efectos sinérgicos que surgen a partir de la acción combinada de ácido celobiónico y otras celodextrinas oxidadas, o a partir de la acción combinada de celodextrinas oxidadas tales como ácido celobiónico y celodextrinas nativas como las encontradas en la mezcla de AA9_COS, para varias lecturas relevantes para las defensas vegetales. Jamás se ha demostrado que la más pequeña de las celodextrinas oxidadas, el ácido celobiónico, hasta donde se sabe active las defensas vegetales, y que siquiera logre efectos diferentes de y superiores a o más fuertes que los de la celobiosa. De manera interesante, no se detecta ningún estallido oxidativo después de tratamiento con AA9_COS, pero se observa una reducción del 60 % de la propagación de *Botrytis cinerea in planta*. Juntos, los datos establecen que las mezclas de celodextrinas oxidadas y celodextrinas nativas, así como ciertos componentes individuales, tales como en particular ácido celobiónico, se pueden emplear como un poderoso elicitador de las defensas vegetales, tal como en aplicaciones agrícolas y hortícolas.

Expresión de enzimas de la familia de actividad auxiliar (AA) 9 de polisacárido mono-oxigenasa lítica (LPMO) de *Botrytis cinerea* (BcAA9) durante el ataque de patógenos

Para entender la intervención de las AA9s durante la patogenicidad, se mide la expresión de la familia de genes de actividad auxiliar 9 de *Botrytis cinerea* (BcAA9) 48 horas después de la inoculación de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Entre los diez genes de esta familia, BCIN_05g08230, BCIN_06g00480, BCIN_06g07050 y BCIN_09g06730 se expresan por lo menos al triple con respecto al gen BcTUB (Figura 1A), mientras que el BCIN_12g03920 muestra una expresión incluso más alta. Para predecir la regiospecificidad de las AA9s desplegadas por *B. cinerea* durante la patogenicidad, se construye un árbol filogenético que compara las secuencias de módulo catalítico de BcAA9s con enzimas AA9 estructuralmente resueltas (Figura 1B). Este análisis muestra que tres (BCIN_06g07050, BCIN_09g06730 y BCIN_12g03920) de los cinco genes de BcAA9 expresados *in planta* se agrupan con enzimas AA9s provenientes de otras especies que presentan regiospecificidad para C1/C4. Asimismo, la predicción del dominio catalítico estructural de la enzima BCIN_12g03920, la BcAA9 más altamente expresada, muestra una alta similitud con la estructura TtAA9E del hongo *Thermothielavioides terrestris* (Figura 1C). Por lo tanto, para producir un combinado de celodextrinas que imitan la actividad *in vivo* de las BcAA9s, se eligen la enzima TtAA9E, así como la enzima MtAA9A de nuestra colección. Las celodextrinas obtenidas después de la incubación de TtAA9 con sustrato celulósico (celulosa hinchada con ácido fosfórico, PASC) se purifican con tamices moleculares (3 KDa) y se caracterizan con cromatografía de intercambio aniónico de alto desempeño con detección amperométrica por pulsos (HPAEC-PAD) (Figura 1D). Una caracterización con HPAEC de los componentes individuales de los AA9_COS demuestra una relación 4:5:1 entre celodextrinas nativas, celodextrinas C1-oxidadas y C4-oxidadas, respectivamente. También se analiza la capacidad de los productos para resistir las enzimas beta-glucosidasas degradadoras de celodextrina. Las pruebas de degradación muestran que el ácido celobiónico y la 4-ceto-celobiosa (respectivamente los productos de oxidación de C1 y C4 de la celobiosa), son los únicos productos capaces de resistir la digestión por beta-glucosidasas después de incubación instantánea (menos de 5 minutos).

El tratamiento con una mezcla de celodextrinas oxidadas y celodextrinas nativas induce cambios transcriptómicos en plántulas de *Arabidopsis*

En *Arabidopsis*, se sabe que la inducción de PTI dependiente de DAMP está acompañada de una profunda reprogramación transcripcional de gen inmunológico. En la presente solicitud, se efectúa un análisis de microarreglo de ADNc 1 hora después de los tratamientos con AA9_COS o celobiosa, en plantas de *Arabidopsis* de 14 días de edad. Para ambas sustancias se utiliza la concentración de 100 μ M, porque se reporta que a esta concentración la celobiosa activa la defensa en la raíz de *Arabidopsis* (Souza et al. 2017, *supra*), y también porque el análisis dosis-

respuesta de genes marcadores de la defensa seleccionados, tales como *FRK1* y *WRKY18* (Figuras 2A a 2B), muestra una activación satisfactoria a esta concentración. El análisis transcriptómico se lleva a cabo utilizando el chip de microarreglo 1.0 ST de *Arabidopsis* (Affymetrix, Santa Clara, CA, E.U.A.) y los genes expresados de manera diferencial (DEG por sus siglas en inglés) se seleccionan utilizando dos criterios: las relaciones de expresión de $\log_2 \geq 1,5$ veces o $\geq -1,5$ veces y el valor de p de la prueba de la t de Student $\leq 0,05$. Con dichos criterios se observa que la aplicación exógena de AA9_COS ejerce un poderoso efecto en el transcriptoma de *Arabidopsis*.

Las Figuras 3A a 3D muestran una descripción general acerca del análisis estadístico de los datos de microarreglo obtenidos después de los tratamientos. Este análisis destaca cambios en la expresión de 935 genes en plantas tratadas con AA9_COS, entre estos se activan 664 genes, y se reprimen 271 genes (Figura 3A). Por otra parte, el tratamiento con celobiosa provoca cambios transcripcionales de 440 genes, de los cuales 346 y 94 son activados o reprimidos, respectivamente (Figura 3A). Interesante, al graficar las relaciones de expresión de gen en valor de p transformado a $\log_{10}$ en una gráfica de volcán se observa que la magnitud de expresión y el nivel de significancia de genes activados desencadenados por ambos tratamientos son más altos en comparación con los genes reprimidos (Figura 3C, 3D). Asimismo, el análisis de componente principal también explica 73 % de la varianza combinada y separa las muestras entre tratamientos (Figura 3B). El grupo de plantas de control se separa de ambos tratamientos. Considerando que el primer componente (PC1) está asociado con la varianza más grande posible (39 %), este claramente explica el efecto de cada tratamiento. Sin embargo, el segundo componente principal (PC2), el cual está asociado con 19 % de la varianza, podría atribuirse a las diferentes respuestas inducidas entre la aplicación de celobiosa y de AA9_COS (Figura 3B). Estos datos están en concordancia con los otros análisis, en donde los cambios en el transcriptoma son claramente diferentes entre los tratamientos.

El cambio transcriptómico inducido por el tratamiento con una mezcla de celodextrinas oxidadas y celodextrinas nativas estaba relacionado principalmente con las respuestas de defensa

Para identificar los procesos biológicos de genes expresados de manera diferencial (DEG) desencadenados por AA9_COS, se realizan análisis de ontología de gen (GO) y de enriquecimiento de ruta como es descrito por Reimand et al. (*Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap*. Nat Protoc. 2019, vol. 14, 482-517). En términos generales, los mapas de enriquecimiento incorporan grupos de términos de GO similares GO para crear redes de nodos y bordes que representan los conjuntos de genes y los genes traslapados entre los conjuntos de genes, respectivamente. El análisis de GO se realiza utilizando el software g:Profiler (Raudvere et al., "g:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists". *Nucl. Acids Res.* 2019, vol. 47, 191-198). La mayoría de los términos de GO están relacionados con la defensa vegetal, incluyendo respuestas a heridas, interacción incompatible y ataques de bacterias y patógenos. AA9_COS también activa los genes implicados en las rutas de señalización de JA y SA, la acumulación de callosa y la respuesta a la quitina elicitora fúngica. Por ejemplo, los términos de GO con valores de p /valores de FDR particularmente significativos incluyen:

GO:0002376, proceso del sistema inmunitario, GO:0042742 respuesta de defensa a bacteria, GO:0009408 respuesta al calor, GO:0006955 respuesta inmunológica, GO:0045087 respuesta inmunológica innata, GO:0046677 respuesta a antibiótico, GO:0010200 respuesta a quitina, GO:0050832 respuesta de defensa contra hongos, GO:0009620 respuesta a hongos, GO:0042542 respuesta a peróxido de hidrógeno, GO:0034605 respuesta celular al calor, GO:0046777 auto-fosforilación de proteína, GO:0009817 respuesta de defensa contra hongos, interacción incompatible, GO:0052542 respuesta de defensa por acumulación de callosa, GO:0009644 respuesta a intensidad alta de luz, GO:0031347 regulación de la respuesta de defensa, GO:0010243 respuesta a compuesto de organonitrógeno, GO:0009814 respuesta de defensa, interacción incompatible, GO:0000302 respuesta a especies de oxígeno reactivo, GO:0009636 respuesta a sustancias tóxicas y GO:0006979 respuesta a estrés oxidativo.

Para visualizar mejor el análisis de GO, se agrupan los términos de GO utilizando la herramienta "Autoannotate" de cytoscape obteniendo de esta manera 10 grupos asociados a respuestas de defensa (Figura 4). Entre estos, los cinco grupos más enriquecidos se definen como regulación inmunológica innata (22 nodos), modulación de la pared celular (12 nodos), interacción incompatible (9 nodos), proceso metabólico de glucosinolato (8 nodos) y respuesta al estrés oxidativo (5 nodos) (Figura 4). En resumen, el análisis de enriquecimiento de ruta revela que la exposición de plantas de *Arabidopsis* a AA9_COS incrementa la expresión de genes asociados con varios niveles de defensa vegetal.

La comparación amplia del genoma demuestra que las celodextrinas oxidadas actúan con más fuerza para desencadenar los genes asociados con la defensa que las celodextrinas nativas

Para elucidar las diferencias y traslapes en las respuestas del transcriptoma entre AA9_COS y la aplicación de celobiosa, se realiza una comparación de transcriptoma por pares (Figuras 5A a 5E). El agrupamiento jerárquico revela conjuntos de genes (grupos I y II) que son activados de manera más intensa por AA9_COS que por el tratamiento con celobiosa, mientras que se detecta expresión génica comparable en genes que pertenecen al grupo III (Figura 5A, Tabla II).

TABLA II Agrupamiento jerárquico de genes expresados de manera diferencial después de AA9_COS 100 μ M o celobiosa 100 μ M en plantas Col-0 (grupo I). Los valores representan el cambio en número de veces de la expresión de genes en comparación con el control.

Código AGI	Descripción del gen	AA9_COS	Celobiosa
AT2G19190	Quinasa 1 de tipo receptor inducida por FLG22	14,83	1,38
AT2G43620	Proteína de la familia de la quitinasa	12,32	2,15
AT3G46280	Proteína de tipo proteína quinasa	25,18	4,51
AT1G14540	Peroxidasa 4	6,81	1,22
AT2G17740	Proteína que contiene el dominio C1 rica en cisteína/histidina	6,16	1,04
AT2G36690	Proteína de la superfamilia de la oxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato (2OG) y Fe(II)	9,57	1,99
AT1G36640	proteína hipotética	6,14	1,27
AT5G64120	peroxidasa 71	6,04	1,42
AT1G51850	Proteína de la familia de proteína quinasa de repetición rica en Leucina	14,58	4,14
AT1G74310	proteína chaperona ClpB1	10,50	2,87
AT3G24500	Factor 1c para puenteo multiproteínico	6,50	1,75
AT2G39200	Proteína 12 del locus O de resistencia al mildiu	8,29	2,09
AT2G46240	atanogen 6 asociado a BCL-2	7,86	2,00
AT4G22710	citocromo P450, familia 706, subfamilia A, polipéptido 2	4,40	1,15
AT1G07400	proteína de choque térmico clase I	8,78	2,58
AT1G49000	proteína hipotética	5,59	1,67
AT2G26150	factor A-2 de transcripción de estrés térmico	7,22	2,19
AT4G01700	proteína de la familia de la quitinasa	4,08	1,23
AT1G52200	proteína de la familia PLAC8	5,14	1,57
AT1G51800	proteína quinasa de repetición rica en leucina putativa	7,87	2,44
AT1G54050	proteína de choque térmico CIII 17.4	4,38	1,36
AT2G27660	proteína que contiene dominio C1 rica en cisteína/histidina	5,22	1,63
AT5G52640	proteína de choque térmico 90.1	9,82	3,70
AT1G51790	proteína tipo proteína quinasa de repetición rica en leucina	5,34	1,99
AT1G79680	10 tipo quinasa de receptor asociado a pared	4,42	1,62
AT2G39518	proteína hipotética	6,67	2,22
AT3G09350	proteína Fes1A	6,70	2,18
AT2G26560	fosfolipasa A 2A	6,25	2,02
AT1G36622	proteína hipotética	5,00	1,62
AT2G29500	proteína de la familia HSP20	8,78	3,11
AT5G51440	proteína de choque térmico 23.5	3,83	1,36
AT1G30700	proteína de la familia de berberina de unión a FAD	5,05	1,73
AT4G26200	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintetasa 7	6,20	2,14
AT1G51920	proteína hipotética	4,48	1,55
AT5G57220	citocromo P450, familia 81, subfamilia F, polipéptido 2	3,08	1,07
AT5G05300	proteína hipotética	4,48	1,78
AT1G13520	proteína hipotética	5,13	2,05
AT2G39210	proteína facilitadora mayor	4,16	1,67
AT5G39580	peroxidasa 62	9,34	3,82
AT3G26210	citocromo P450 71B23	3,32	1,35
AT2G15220	proteína de la familia de proteína secretora básica	2,66	1,08
AT3G16030	serina/treonina proteína quinasa tipo receptor S de lectina tipo GCES101	3,79	1,47
AT5G48570	peptidil-prolil cis-trans isomerasa FKBP65	8,71	3,39
AT1G55450	proteína de la superfamilia de metiltransferasas dependiente de S-adenosil-L-metionina	3,05	1,19
AT1G02920	glutación S-transferasa F7	2,81	1,10

(continuación)

Código AGI	Descripción del gen	AA9_COS	Celobiosa
AT1G11100	proteína que contiene dominio de SNF2, de helicasa y de dedo de zinc	4,10	1,70
AT3G51910	factor A-7a de transcripción de estrés térmico	3,25	1,35
AT5G67450	proteína de dedo de zinc 1	3,49	1,44
AT1G30755	proteína hipotética	2,61	1,08
AT1G19020	proteína hipotética	4,01	1,68
AT1G61360	serina/treonina proteína quinasa tipo receptor S de lectina tipo G	2,82	1,18
AT4G11000	proteína que contiene repetición de anquirina	2,95	1,23
AT5G15870	proteína de la familia 81 de glucosil hidrolasa	2,73	1,14
AT1G02930	glutación S-transferasa F6	2,80	1,18
AT5G37670	proteína de choque térmico 15,7	2,47	1,04
AT1G02360	quitinasa putativa	2,45	1,03
AT1G51820	SIF2	15,74	6,99
AT1G59865	proteína hipotética	5,93	2,57
AT5G48540	proteína de la familia relacionada a proteína quinasa tipo receptor	4,26	1,85
AT5G44585	proteína hipotética	5,04	2,20
AT1G64400	acilo de cadena larga-CoA sintetasa	2,70	1,18
AT1G24145	proteína hipotética	2,62	1,15
AT1G61560	proteína 6 tipo MLO	2,59	1,14
AT5G46050	transportador de péptido 3	4,05	1,74
AT5G44910	proteína que contiene dominio Toll-Interleuquina-Resistencia	2,57	1,10
AT1G27020	proteína hipotética	2,49	1,06
AT3G14200	proteína que contiene dominio de DnaJ de chaperón	5,59	2,55
AT5G19230	precursor de membrana de glucoproteína anclada a GPI	2,73	1,24
AT1G51890	probable proteína quinasa tipo receptor de LRR	4,23	1,91
AT3G22060	proteína de la familia relacionada con proteína quinasa tipo receptor	2,90	1,31
AT1G18570	proteína 51 de dominio myb	3,23	1,46
AT4G21120	transportador de aminoácido 1	2,39	1,07
AT4G23280	proteína quinasa 20 tipo receptor rica en cisteína putativa	2,54	1,14
AT5G39020	proteína quinasa tipo receptor putativa	2,27	1,02
AT4G01750	ramnogalacturonano xilosiltransferasa 2	5,63	2,59
AT3G54420	quitinasa clase IV	3,75	1,74
AT5G10695	proteína hipotética	4,81	2,27
AT5G37600	glutamina sintetasa 1;1	3,29	1,56
AT5G44070	glutación gamma-glutamylcisteiniltransferasa 1	3,02	1,44
AT5G48530	proteína hipotética	4,41	2,07
AT4G25110	metacaspasa 2	3,71	1,74
AT5G14470	proteína de la familia de quinasa GHMP	2,58	1,21
AT2G44490	PEN2	2,56	1,20
AT3G15500	factor de transcripción de dominio NAC tipo ATAF	2,57	1,20
AT1G14200	proteína que contiene dominio de dedo de RING	3,72	1,86
AT3G12910	regulador transcripcional que contiene dominio de meristemo no apical	2,73	1,36
AT1G18382	---	2,81	1,39
AT4G23220	proteína quinasa 14 tipo receptor rica en cisteína	3,49	1,69
AT4G12400	proteína de repetición de tetratricopéptido-pinza de carboxilato	6,70	3,23
AT4G27280	proteína que contiene el motivo de unión a calcio mano EF (EF-hand)	2,76	1,33
AT5G35320	proteína hipotética	2,12	1,02
AT1G65845	proteína hipotética	4,08	1,99
AT4G15233	miembro 42 de la familia de transportador ABC	3,41	1,66
AT1G03220	proteína tipo aspartil proteasa	2,22	1,08

(continuación)

Código AGI	Descripción del gen	AA9_COS	Celobiosa
AT4G22470	proteína de la familia de inhibidor de proteasa/almacenamiento de semilla /proteína de transferencia de lípido (LTP)	3,47	1,77
AT3G12580	proteína de choque térmico 70-4	6,41	3,24
AT2G22880	proteína que contiene el motivo VQ	2,66	1,35
AT3G08970	Proteína de dominio J ATERDJ3A	4,77	2,46
AT4G11890	quinasa citosólica tipo receptor ARCK1	3,40	1,75
AT4G38550	familia de la proteína tipo fosfolipasa (PEARL1 4)	3,11	1,60
AT1G16110	6 tipo quinasa asociada a pared	2,84	1,46
AT1G53625	proteína hipotética	3,02	1,55
AT4G23570	fosfatasa SGT1a	4,29	2,22
AT5G62020	factor B-2a de transcripción de estrés térmico	1,93	1,00
AT2G36220	proteína hipotética	2,76	1,44
AT2G38870	proteína de la familia de inhibidor de proteinasa PR-6	2,44	1,27
AT2G02010	glutamato descarboxilasa 4	2,12	1,11

Dichos grupos contienen la mayoría de los genes marcadores defensivos centrales tales como *FRK1*, *WRKY33*, *NAC055*, así como varios receptores de LRR y quinasa de receptores asociados a la pared (Figuras 5B y 5C, tabla I). Sin embargo, el grupo V para el cual se detectan perfiles de expresión opuestos entre celobiosa (reprimidos) y AA9_COS (activados), contiene *WRKY40* el cual se sabe que es importante en la señalización de respuestas de inmunidad contra patógenos biotróficos. Este análisis muestra que AA9_COS ejerce un efecto más poderoso para desencadenar respuestas de defensa vegetal en comparación con celobiosa.

El grupo IV, el cual agrupa genes activados solamente por el tratamiento con celobiosa (Figura 5A), presenta genes asociados con el metabolismo de la celulosa y de carbohidratos, así como términos GO de crecimiento celular, lo que sugiere que probablemente la celobiosa es más fácilmente metabolizada por las plantas que AA9_COS.

Se demuestra que el ácido celobiónico solo tiene una capacidad elicitora similar o incluso más alta con respecto a una cantidad idéntica de la mezcla de celodextrinas oxidadas y nativas (AA9_COS) así como con respecto a ácido celotriónico para provocar los marcadores génicos de la defensa vegetal específicos *CYB81F2* y *RBOHD* (Figuras 6A a 6C), mientras que el marcador *WRKY30* genérico que se sabe es activado por celodextrinas nativas solamente fue activado por AA9_COS.

Con relación al número total de genes comúnmente inducidos, los genes activados (22,1 %, 184 genes) son casi cuatro veces más numerosos en comparación con los genes reprimidos (15,1 %, 48 genes) (Figura 5D). De manera interesante, incluso aunque un gran número de genes activados compartidos están asociados con respuestas de defensa, incluyendo genes responsivos a SA (ácido salicílico) y a JA (ácido jasmónico) (Figura 5E), los genes activados por AA9_COS están mucho más enriquecidos en la respuesta de defensa como queda indicado por los valores de $-\log_2(\text{FDR})$ mucho más altos (Figura 5E).

De manera similar, se encontró que los genes dependientes de SA y de JA están bastante enriquecidos entre los genes activados mediante tratamiento con AA9_COS, mientras que se detecta un enriquecimiento insignificante en genes responsivos a ET (etileno) (Figura 5E). En conjunto, estos resultados sugieren que AA9_COS desencadena una magnitud de expresión de genes de defensa considerablemente más alta que la celobiosa, lo cual indica que las celodextrinas oxidadas, tales como los ácidos aldónicos, tal como en particular el ácido celobiónico, contribuyen en gran medida a la inducción de genes de defensa. Los datos incluso permiten postular que un efecto sinérgico que surge de la acción combinada del ácido celobiónico y de otras celodextrinas oxidadas, o de la acción combinada de celodextrinas oxidadas tal como ácido celobiónico y celodextrinas nativas como las encontradas en la mezcla de AA9_COS, se observa para varias lecturas relevantes para las defensas vegetales.

Estas predicciones se demuestran adicionalmente mediante la cuantificación con espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida (LC-MS) de SA y JA y detección de gases con láser para el etileno, con relación a plantas tratadas con AA9_COS (Figuras 16A a 16C). Se detecta un incremento de aproximadamente cuatro veces y ocho veces en los niveles de SA y JA, respectivamente, 24 horas después del tratamiento con AA9_COS en comparación con la simulación. En cambio, el etileno se monitorea en un análisis de curso de tiempo desde las aplicaciones inmediatas de AA9_COS hasta las siguientes 24 horas. Se observa un incremento de ET temprano del doble 2 horas después del tratamiento con AA9_COS en comparación con la simulación y el nivel de ET significativamente más alto dura hasta 4 horas después del tratamiento, lo cual es típico para esta hormona volátil (Figura 16C).

Componentes de la transducción de señalización modulados por una mezcla de celodextrinas oxidadas y celodextrinas nativas

Los factores de transcripción (TF por sus siglas en inglés) son elementos reguladores que actúan corriente arriba en las rutas de señalización. El análisis transcriptómico muestra que AA9_COS activa TF específicos relacionados con la defensa que pertenecen a diferentes familias tales como MYB, NAC y WRKY.

Los genes de TF de WRKY actúan como reguladores esenciales para las respuestas desencadenadas por patógeno en numerosas especies vegetales. Diez miembros de la familia TF de WRKY son activados de manera significativa por AA9_COS, entre los cuales *WRKY18* es el más expresado (tabla I). Previamente, se ha demostrado que *WRKY18* actúa en complejo con *WRKY40* y *WRKY60*, mientras que *WRKY18*, 33 y 40 son jugadores centrales en la señalización de las respuestas defensivas tempranas dependientes de FLG22 (Birkenbihl *et al.*, "Induced Genome-Wide Binding of Three *Arabidopsis* WRKY Transcription Factors during Early MAMP-Triggered Immunity". *Plant Cell*. 2017, vol. 29(1), 20-38). Aunque la expresión de *WRKY60* no es inducida de manera significativa ($p > 0,05$) por AA9_COS, la expresión de *WRKY40* y *WRKY33* es aproximadamente 2 veces más alta en comparación con las plantas tratadas con simulación. Por el contrario, se encontró que solamente *WRKY18*, 22 y 11 son activados de manera significativa por celobiosa (tabla I).

Otra clase de TF que juega papeles importantes para regular las respuestas al estrés tanto biótico como abiótico está representada por la familia de TF de NAC (Nuruzzaman *et al.*, "Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants". *Front Microbiol*. 2013, vol. 4, 248). Cinco genes de NAC son activados de manera significativa por AA9_COS, tres de los cuales también son inducidos de manera significativa por la celobiosa (tabla I). De manera importante, previamente se ha demostrado que el gen de NAC más inducido por AA9_COS, a saber, *NAC055*, actúa como regulador clave para los genes responsivos a JA (Hickman *et al.*, "Architecture and dynamics of the jasmonic acid gene regulatory network". *Plant Cell* 2017, vol. 29, 2086–2105). Esto también podría ser subyacente al enriquecimiento más alto de respuestas dependientes de JA observadas en plantas tratadas con AA9_COS que en plantas tratadas con celobiosa (Figura 5E).

De igual manera, los miembros de la familia de TF de MYB son inducidos por AA9_COS. Aunque muchos genes de MYB también son modulados de manera significativa por celobiosa, se observa un incremento significativo en la expresión del gen *MYB51* después de tratamiento con AA9_COS. Dado que *MYB51* es el regulador principal de la acumulación de glucosinolato de indol dependiente de MAMP en *Arabidopsis* (Frerigmann *et al.*, "Regulation of Pathogen-Triggered Tryptophan Metabolism in *Arabidopsis thaliana* by MYB Transcription Factors and Indole Glucosinolate Conversion Products". *Mol Plant*. 2016, vol. 9(5), 682-695), esto indica que AA9_COS también pudiera proteger plantas mediante esta ruta de metabolito secundario.

TABLA I

Cambios en no. de veces de la expresión de genes de factores de transcripción seleccionados implicados en los procesos asociados con la señalización de hormonas y la defensa

Familia del factor de transcripción	Identificador del gen	Conjunto de sonda	Anotación	Cambio en no. de veces (tratamiento/CTR)			
				Celodextrinas		Celobiosa	
				Expresión	valor de p	Expresión	valor de p
WRKY TF	AT4G31800	13476200	WRKY19	3.32	0.005	4.02	0.05
	AT7G03250	13414799	WRKY25	2.86	0.026	2.31	> 0.05
	AT4G31250	13480886	WRKY22	2.75	0.001	2.34	0.03
	AT2G38470	13402363	WRKY33	2.38	0.050	1.33	> 0.05
	AT5G15130	13501728	WRKY72	2.34	0.038	1.41	> 0.05
	AT5G04110	13530190	WRKY30	2.28	0.012	1.30	> 0.05
	AT4G31550	13492012	WRKY11	2.19	0.006	1.95	0.00
	AT1G08040	13361730	WRKY40	1.82	0.043	-1.05	> 0.05
	AT2G33320	13386306	WRKY15	1.68	0.015	-1.06	> 0.05
	AT1G18960	13341389	WRKY61	1.54	0.050	-1.05	> 0.05
	AT3G15310	13428035	NAC055	2.57	0.039	1.20	> 0.05
	AT3G34070	13444373	NAC107	2.29	0.014	1.81	0.05
	AT3G17730	13429694	NAC057	1.62	0.030	1.40	0.05
NAC TF	AT5G03410	13497454	NAC078	1.57	0.007	1.31	0.00
	AT3G18400	13450347	NAC058	1.52	0.017	1.41	> 0.05
	AT3G19570	13431812	MYB51	3.23	0.018	1.46	> 0.05
	AT1G76970	13488340	Objetivo de la proteína MYB 1		0.007	3.63	> 0.05
	AT4G37260	13478745	MYB75	1.69	0.020	1.06	> 0.05

Además, para confirmar la reproducibilidad de los datos de expresión de gen del presente microarreglo, se analizan adicionalmente 10 genes (listados en la tabla S1) mediante qPCR utilizando alícuotas del mismo ARN hibridado en arreglo. Los valores determinados por la qPCR están bien correlacionados con las relaciones generadas a partir de los resultados del microarreglo ($R^2 = 0,91$, $FDR = 3,9e^{-8}$; Figura 7), incluso si los valores de expresión obtenidos a partir de los datos del microarreglo generalmente subestiman los enriquecimientos en número de veces determinados por la qPCR.

TABLA S1 Lista de genes utilizados para correlacionar los datos de expresión de qPCR y de microarreglo

Código AGI	Nombre del gen	Condición	qPCR	Microarreglo
At1G21120	IGMT2	Celobiosa vs simulación	-1,59	-1,14
		AA9_COS vs simulación	5,35	5,81
AT1G72520	LOX4	Celobiosa vs CTR	0,69	1,68
		AA9_COS vs CTR	2,78	2,48
AT3G45640	MPK3	Celobiosa vs CTR	0,02	1,22
		AA9_COS vs CTR	1,52	1,44
AT2G43790	MPK6	Celobiosa vs CTR	0,55	-1,06
		AA9_COS vs CTR	1,32	1,13
AT3G26830	PAD3	Celobiosa vs CTR	-1,06	-1,04
		AA9_COS vs CTR	1,67	1,31
AT1G59870	PEN3	Celobiosa vs CTR	1,07	1,55
		AA9_COS vs CTR	2,93	2,72
AT2G14610	PR1	Celobiosa vs CTR	1,29	1,91
		AA9_COS vs CTR	1,44	1,44
AT4G31800	WRKY18	Celobiosa vs CTR	2,60	4,02
		AA9_COS vs CTR	3,65	3,32
AT4G01250	WRKY22	Celobiosa vs CTR	1,10	2,34
		AA9_COS vs CTR	2,96	2,75
AT2G38470	WRKY33	Celobiosa vs CTR	1,31	1,33
		AA9_COS vs CTR	2,64	2,38

Una mezcla de celodextrinas oxidadas y celodextrinas nativas no induce el estallido oxidativo en hojas de *Arabidopsis*

La generación transitoria y rápida de especies reactivas a oxígeno (ROS) apoplásicas, referidas como estallido oxidativo, es un sello distintivo de la respuesta temprana a varios MAMP y tratamientos con elicitores químicos (Torres *et al.*, "Reactive oxygen species signaling in response to pathogens". *Plant Physiol.* 2006, vol. 141(2), 373-8; Zarattini *et al.*, 2017, *supra*). Para evaluar la producción *in situ* de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido (O_2^-), se efectúan dos pruebas histoquímicas clásicas con DAB y NBT 24 horas después de los tratamientos en plantas de 5 semanas de edad. Como se muestra en las Figuras 8A y 8B, no se detecta producción mensurable de H_2O_2 y O_2^- después de tratamientos con cualquiera de AA9_COS o celobiosa. Asimismo, para evaluar la producción de H_2O_2 extracelular a corto plazo, se lleva a cabo la prueba basada en luminol en plantas de 14 días de edad (Figura 8C). De manera similar, no se detecta ninguna producción de H_2O_2 en esta prueba a partir de la exposición a AA9_COS o celobiosa, lo que indica que cualquiera de los tratamientos con AA9_COS o celobiosa desencadena el

sistema inmunitario de la planta de forma independiente al estallido oxidativo.

Las celodextrinas oxidadas desencadenan la defensa basal de la planta e incrementan la protección contra *B. cinerea* de forma diferente a las celodextrinas nativas

Para demostrar que los presentes tratamientos inducen la protección contra hongos necrotróficos, de acuerdo con los datos de expresión de gen (Figura 4), plantas de cinco semanas de edad se tratan con gotas minúsculas con cualquiera de AA9_COS 100 μ M o celobiosa 100 μ M y las hojas se inoculan con 10 μ l de suspensión de esporas de *B. cinerea* (5×10^5 esporas ml^{-1}) 24 horas después de los tratamientos. Tres días después de la inoculación del hongo, las áreas de las lesiones necróticas en desarrollo se analizan mediante el software ImageJ y el crecimiento "in planta" de *B. cinerea* se evalúa a través de qPCR. Las fotografías representativas de las lesiones necróticas formadas en plantas tratadas y no tratadas se muestran en la Figura 9A. Los tamaños promedio de las lesiones necróticas desarrolladas en hojas pretratadas con AA9_COS están significativamente reducidos en 30 % cuando se comparan con las hojas no tratadas mientras que se observa una protección pequeña contra *B. cinerea* en plantas tratadas con celobiosa (Figura 9B). Los datos de morfología de la lesión resultantes están bien correlacionados con el crecimiento "in planta" llevado a cabo 3 días después de la infección. De hecho, se observa una reducción en el crecimiento de la biomasa del hongo de aproximadamente 50 % en plantas pretratadas con AA9_COS, mientras que se detecta una ligera reducción en el crecimiento de *B. cinerea* en plantas pretratadas con celobiosa (Figura 9C). Por lo tanto, en este experimento ambos tratamientos tienen un efecto positivo para proteger *Arabidopsis* contra la infección por *B. cinerea*, con AA9_COS actuando considerablemente más fuerte en comparación con la celobiosa (Figura 9C).

De hecho, el análisis de enriquecimiento de términos de GO muestra que los grupos de genes activados por AA9_COS están asociados con la "modificación de la pared celular". Entre estos, varios genes están asociados con la acumulación de callosa en la pared celular (Figura 4). Para explicar experimentalmente esto, la callosa se tiñe a las 6 y 24 horas después de tratamientos con AA9_COS 100 μ M, celobiosa 100 μ M o FLG22 1 μ M en plantas de *Arabidopsis* de 5 semanas de edad (Figura 9D). En ambos puntos de tiempo se detecta un incremento significativo en la acumulación de callosa después de tratamiento con AA9_COS. Por el contrario, no se detectan manchas de callosa visibles después del tratamiento con celobiosa. De manera interesante, se observan dinámicas y amplitudes diferentes en la acumulación de callosa entre el tratamiento con AA9_COS y con FLG22, con el primero actuando más fuerte a las 24 horas después del tratamiento y el segundo actuando más fuerte a las 6 horas (Figura 9D).

En conjunto estos resultados confirman que AA9_COS induce resistencia contra el hongo necrotrófico *B. cinerea* la cual es más pronunciada o intensa que la resistencia inducida por la celobiosa.

Una mezcla de celodextrinas oxidadas y celodextrinas nativas desencadena la biosíntesis y señalización de camalexina

Los estudios previos han demostrado que la acumulación de camalexina derivada de triptófano es una respuesta clave para mejorar la resistencia contra *B. cinerea*. La regulación de la biosíntesis de camalexina que ocurre durante el ataque de patógenos ha sido bien descrita (He *et al.*, "The *Arabidopsis* Pleiotropic Drug Resistance Transporters PEN3 and PDR12 Mediate Camalexin Secretion for Resistance to *Botrytis cinerea*". *Plant Cell*. 2019, vol. 31(9), 2206-2222). Esta ruta involucra la activación del módulo de señalización de MPK3-MPK6-WRKY33 el cual a su vez induce la expresión de *PAD3* junto con *PDR12* y *PEN3*, dos genes transportadores de resistencia a fármaco pleiotrópico.

Se lleva a cabo qPCR en tiempo real y se analizan los perfiles de expresión de estos genes en plantas de *Arabidopsis* de 14 días de edad 1 y 24 horas después de los tratamientos con AA9_COS 100 μ M o celobiosa 100 μ M. Excepto para *PDR12* (datos no mostrados), se observa una acumulación significativa de ARNm de *MPK3/6*, *WRKY33*, *PAD3* y *PEN3* después de la aplicación de AA9_COS en comparación con las muestras tratadas tanto con simulación como con celobiosa (Figura 10A). Aparte de *PAD3*, se observan perfiles de expresión de gen comparables después de tratamiento con celobiosa, aunque a una magnitud de expresión más baja en comparación con plantas tratadas con AA9_COS (Figura 10A).

La Figura 10C ilustra la cuantificación de camalexina en Col-0, mutantes KO *sif2* y *sif4* de 14 días de edad 24 horas después de los tratamientos con AA9_COS 100 μ M, con celobiosa 100 μ M o con simulación. Para cada tratamiento, la camalexina se extrae a partir de un combinado de *Arabidopsis* de 14 días de edad. Brevemente, se empapan 100 mg de muestras molidas en estado congelado utilizando metanol al 80 % (v:v) en una relación 1:1 (m/v). Después de la homogenización, el sobrenadante se recupera a través de centrifugación a $17.000 \times g$ durante 5 minutos y se evapora a 50 °C en atmósfera de gas nitrógeno. Por último, los residuos se vuelven a suspender en metanol de grado LC de alto desempeño y se filtran con filtros de 0,22 μ m. Después cada combinado se analiza tres veces mediante LC-MS, utilizando una columna Polar C18 de 5 μ m LUNA® Omega de fase inversa (250 x 4,6 mm). Las fases móviles están constituidas por 0,1 % en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El gradiente aplicado es el siguiente: 0–2 minutos, 10 % de B; 2–13 minutos, 10–98 % de B; 13–23 minutos, 98 % de B; 23–25 minutos, 98–10 % de B; 25–30 minutos, 98 % de B; post-corrida 1 minuto.

La celobiosa y la simulación producen niveles comparables de camalexina (simulación = $2,4 \pm 1,4$ ng g⁻¹, celobiosa = $3,7 \pm 1,8$ ng g⁻¹), mientras que AA9_COS produce $35,0 \pm 2,4$ ng g⁻¹ en plantas Col-0. Por el contrario, no se observa ninguna producción de camalexina, junto con un incremento del crecimiento de *B. cinerea in planta*, en plantas tanto *sif2* como *sif4* tratadas con AA9_COS.

La Figura 10D ilustra la cuantificación inmunohistoquímica o análisis de transferencia Western tempranos de la fosforilación de MPK3/6 después de los tratamientos indicados. Plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre, mutantes *sif2* y *sif4* de catorce días de edad se tratan con AA9_COS 100 µM, con celobiosa 100 µM o con simulación. Las hojas se recolectan 5 minutos después del tratamiento, se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 °C para análisis. Después de la extracción de proteína, para cada muestra se desnaturalizan 20 µg de proteínas y se separan en geles para SDS-PAGE con 12 % de acrilamida/bis-acrilamida. Las proteínas separadas se transfieren en una membrana Immobilon-PPVDF de 0,45 µm (Millipore). El bloqueo se efectúa en TBST que contiene leche descremada en polvo al 5 %, y las transferencias se incuban durante toda la noche a 4 °C con anticuerpos específicos (anti-AtMPK6 y anti-fosfo-p44/42 MPK (Thr202/Tyr204)), se lavan en TBST, y se incuban con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) diluida a 1/10.000. La detección quimioluminiscente de HRP se efectúa con el sustrato Clarity™ Western ECL y el sistema de imagenología ChemiDoc™MP.

La fosforilación temprana de MPK3/6 se detecta después de tratamiento con AA9_COS 100 µM, mientras que no se observa ninguna fosforilación después de los tratamientos con celobiosa 100 µM en plantas Col-0 (Figura 10D y datos no mostrados). Por lo tanto, las proteínas MPK3/6 y sus formas fosforiladas (pMPK3/6) se hibridan en líneas Col-0, *sif2* y *sif4* mutantes. Después de tratamiento con AA9_COS, se observa una señal para la pMPK3/6 ambas en las líneas Col-0 y *sif2* y *sif4* KO, incluso si se observa una ligera disminución en las formas pMPK3/6 en las líneas *sif4* KO (Figura 10D y datos no mostrados).

SIF2 y SIF4, dos LRR-RLK, parecen estar involucradas en la activación de defensas impulsada por una mezcla de celodextrinas oxidadas y celodextrinas nativas

El análisis transcriptómico destaca varios genes PRR siendo modulados por el tratamiento con AA9_COS. Entre ellos, dos quinasas tipo receptor de repetición rica en leucina (LRR-RLK por sus siglas en inglés), a saber, el factor 2 y 4 inducido por estrés (*SIF2* y *SIF4*), son fuertemente activados y están presentes en el grupo 1 (Figura 5D). Para evaluar si *SIF2* y *SIF4* juegan o no un papel en la señalización de la activación del gen de defensa dependiente de AA9_COS, los mutantes con pérdida de función *sif2-1* y *sif4-1* se tratan con gotas minúsculas con AA9_COS 100 µM y se evalúa la expresión de cuatro genes marcadores, *FRK1*, *WRKY18*, *WRKY22* y *WRKY33*, 1 hora después del tratamiento (Figura 11). En ambos mutantes *sif2-1* (Figura 11) y *sif4-1* (no mostrado) la expresión de gen de todos los genes marcadores analizados no es activada por el AA9_COS mientras que el incremento en la expresión de estos genes en plantas de tipo silvestre es marcado, lo que indica que dichas LRR-RLK probablemente están comprendidas entre los reguladores clave en la señalización de la activación de la expresión de gen de PTI dependiente de AA9_COS.

Protección de tomates

Se demuestra la protección de plantas de tomate contra el patógeno *Botrytis cinerea* utilizando varias concentraciones (control negativo (CTR), 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) de celodextrinas de AA9_COS (celodextrinas nativas, celodextrinas C1-oxidadas y C4-oxidadas 4:5:1) utilizando la prueba de síntomas de Bc como se describió anteriormente. Los valores representan el tamaño de las áreas de lesión producidas durante la infección con el patógeno, es decir, valores más bajos que los del control sugieren que los mecanismos de defensa se provocaron. Se observan efectos benéficos de entrada con la concentración más baja de AA9_COS, es decir, 0,1 µM, y ya son pronunciados con 10 µM (Figura 12).

Comparación de la celobiosa contra una mezcla de celodextrinas oxidadas y celodextrinas nativas en tomates

Se compara la protección de plantas de tomate contra el patógeno *Botrytis cinerea* utilizando celobiosa 100 µM o AA9_COS 100 µM ("CTR" es control negativo). Los valores representan el tamaño de las áreas de lesión producidas durante la infección con el patógeno, es decir, valores más bajos que el control sugieren que los mecanismos de defensa se provocaron. La celobiosa sola demuestra menos efecto protector que la mezcla de AA9_COS (Figura 13). Todos los experimentos se llevan a cabo en plantas de tomate de 4 semanas de edad infectadas con 10⁶ esporas por mililitro de *Botrytis cinerea*.

Comparación de la actividad elicitora vegetal de mezclas de celodextrinas oxidadas y celodextrinas nativas que tienen diferentes relaciones molares de componentes

Se analiza la protección de plantas de tomate contra el patógeno *Botrytis cinerea* utilizando varias combinaciones de celodextrinas nativas y celodextrinas C1-oxidadas, C4-oxidadas, y opcionalmente C1 y C4-oxidadas (doble oxidadas) (Figura 14). En particular, los numerales en la Figura 14 representan mezclas con las siguientes

proporciones molares de los componentes de celodextrina respectivos:

nativa:C1-oxidada:C4-oxidada

5 (1) 4:5:1; (2) 6,5:3:0,5; (3) 3:6,5:0,5; (4) 4:3:3; (5) 4:1:5; (6) 0,5:9:0,5;

nativa:C1-oxidada:C4-oxidada:doblemente oxidada

(7) 0,5:4:0,5:5; (8) 2,5:2,5:2,5:2,5.

10 Las cantidades molares por partes de los componentes se ajustan utilizando una combinación de técnicas conocidas para aislar los componentes respectivos y para mezclar íntimamente los mismos. "CTR" representa el control negativo, agua.

15 Los valores representan el tamaño de las áreas de lesión producidas durante la infección con el patógeno, es decir, valores más bajos que el control sugieren que los mecanismos de defensa se provocaron. Todos los experimentos se llevan a cabo en plantas de tomate de 4 semanas de edad infectadas con 10^6 esporas de *Botrytis cinerea*. Todas las mezclas se aplican teniendo la misma concentración de masa molar de 100 μ M.

20 Por lo general todas las mezclas utilizadas han provocado exitosamente defensas vegetales. En este modelo experimental, la mezcla más activa es 4:5:1 y la menos activa 4:3:3, con otras mezclas dando protección intermedia.

25 **Ejemplo 3: Obtención de los AA9_COS a partir de desperdicio de biorrefinería o de bioprocesamiento de desperdicio diseñado según las necesidades utilizando sustratos celulósicos y enzimas AA9**

30 Las celodextrinas oxidadas o mezclas de celodextrinas nativas y oxidadas, o componentes de las mismas tal como celobiónico, se pueden obtener a partir de varios biorecursos, con frecuencia desperdicio de la industria de biorrefinería basado en lignocelulosa, tal como de acuerdo con los siguientes ejemplos de bioprocesos existentes que generan cantidad de desperdicios que contienen o que consiste en completa o parcialmente de los AA9_COS.

Producción de bioetanol lignocelulósico

35 La producción de bioetanol lignocelulósico utiliza las partes no comestibles de la madera o de los cultivos como fuente de celulosa que se convertirá en azúcares fermentables a través de etapas de reacción químico-enzimática. Las enzimas comercial y ampliamente utilizadas contienen cantidad considerable de AA9 o miembros similares de la familia activa para celulosa de la familia AA considerados LPMO. El sobrante lignocelulósico digerido después de la fermentación y la destilación da como resultado mezclas de fenoles y moléculas derivadas de azúcar no digerida entre las cuales el ácido celobiónico típicamente está presente en porcentaje de 0,1 a 2 % del volumen húmedo total. Debido a que estos cocteles enzimáticos están diseñados para llevar al máximo el aislamiento de monosacáridos, estos contienen cantidades significativas de enzimas beta-glucosidasa que convierten la mayoría de las celodextrinas oxidadas en la versión de disacárido C1 o C4 oxidado no fermentable (ácido celobiónico y 4-cetobiosa), junto con la molécula de glucosa fermentable. Los ejemplos de dichos procesos son la planta Poet-DSM en EE. UU., la tecnología SEKAB en Suecia, la GranBio en Brasil, ST1 en Finlandia, todas operadas por la familia

40

45 Novozymes Cellic Ctec, empresa conjunta de biotecnología Metgen y Graanul en la tecnología Sweetwoods en Estonia, utilizando sus enzimas patentadas que contienen enzimas AA9.

Producción de fibras de nanocelulosa

50 En la nueva industria emergente de fibras de nanocelulosa se da gran interés hacia el uso de las enzimas celulasas que contienen especialmente AA9 como la enzima necesaria para iniciar la apertura de las fibras. Similar a las biorrefinerías lignocelulósicas, estos procesos están generando un flujo sobrante de azúcares. Entre estos el ácido celobiónico está presente en una cantidad que se estima está en un intervalo de 0,1 a 2 % del volumen húmedo total del flujo de desechos de azúcar. La composición ajustable de las enzimas a ser utilizada en estos procesos hace

55

posible configurar sin la presencia de beta-glucosidasa ya que las fibras se deben mantener intactas por lo tanto las posibles celodextrinas oxidadas más largas o mezclas de celodextrinas nativas y oxidadas más largas son obtenibles en vez de principal o solamente la versión de disacárido como en el caso de la biorrefinería de lignocelulosa.

60 *Bioproceso según las necesidades para la valorización de papel usado*

Se contemplan nuevos bioprocesos según las necesidades para la producción directa o aumentada al máximo de celodextrinas oxidadas o mezclas de celodextrinas nativas y oxidadas utilizando sustrato celulósico de bajo costo tal como el papel usado que podría pretratarse enzimáticamente con enzimas AA9 para obtener varias de las celodextrinas oxidadas o mezclas de celodextrinas nativas y oxidadas, antes de su cadena de reciclaje normal (formación de pulpa).

65

Los materiales así obtenidos que contienen celodextrinas oxidadas o mezclas de celodextrinas nativas y oxidadas se pueden aplicar en agrotecnología, ya sea directamente o después de enriquecimiento o purificación o formulación opcional con portadores apropiados.

5

Ejemplo 4: Emanación de etanol (Figura 15)

Tres plántulas de *Arabidopsis* se cultivan in vitro durante 3 semanas en viales de vidrio que contienen medio de Murashige Skoog estéril y los tratamientos se llevan a cabo asperjando AA9_COS 100 μ M, celobiosa 100 μ M, ácido celobiónico 100 μ M o simulación (H_2O). La producción de etileno se analiza en tres experimentos independientes con el detector ETD 300 (Sensor-Sense, Nijmegen, los Países Bajos) bajo una rutina de alto y flujo en la cual el gas de un vial se acumula en un intervalo de 10 minutos, y después se enjuaga hacia el detector. Las barras en la Figura 15 representan la media y la desviación estándar. La producción de etileno es más alta en plántulas de *Arabidopsis* tratadas con AA9_COS o ácido celobiónico que en las plántulas tratadas con simulación. Esto demuestra que los oligosacáridos oxidados contenidos en la mezcla de AA9_COS, especialmente ácido celobiónico, son los responsables de la inducción de la fitohormona vegetal clave relacionada con la defensa Etileno.

10

15

REIVINDICACIONES

1. Uso de ácido celobiónico o una sal fitofarmacéuticamente aceptable del mismo como elicitador de defensa contra patógenos vegetales.
2. Un método para activar la defensa vegetal contra patógenos vegetales que comprende poner en contacto una planta con una cantidad efectiva de ácido celobiónico o una sal fitofarmacéuticamente aceptable del mismo.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el ácido celobiónico o la sal del mismo está comprendido en una composición que adicionalmente comprende una o más celodextrinas; una o más celodextrinas C1-oxidadas, o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas; una o más celodextrinas C4-oxidadas; y/o una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas, o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 o el método de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde el ácido celobiónico o la sal del mismo está comprendido en una composición que adicionalmente comprende uno o más elicitores de la defensa vegetal adicionales, tales como un elicitador vegetal que se selecciona a partir de compuestos derivados de la pared celular de plantas u hongos, particularmente tales como un elicitador vegetal que se selecciona a partir del grupo que consiste en fragmentos de pectina, oligogalacturónidos, celobiosa, xiloglucano, β -1,3-glucano no ramificado, fragmentos de quitina, arabinosa, arabinano, ramnosa, homogalacturonano, ramnogalacturonano I y II, xilogalacturonano, almidón y combinaciones de los mismos.
5. El uso o método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde el grado de polimerización (DP) de dichas celodextrinas, celodextrinas C1-oxidadas, celodextrinas C4-oxidadas y celodextrinas C1 y C4-oxidadas es cada uno de manera independiente de 2 a 10, preferentemente de 2 a 5.
6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde dicho ácido celobiónico, o dichas celodextrinas, celodextrinas C1-oxidadas, celodextrinas C4-oxidadas y celodextrinas C1 y C4-oxidadas son producidas por la descomposición de la celulosa por una o más polisacárido mono-oxigenasas líticas (LPMO).
7. El uso o método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde
 - al menos una de las una o más LPMO pertenece a la familia 9 de actividad auxiliar (AA), tales como LPMO-AA9 de *Botrytis cinerea*, *Thielavia terrestris* o *Myceliophthora thermophila*;
 - se utiliza una o más celobiosa deshidrogenasas (CDH), tales como una CDH proveniente de *Botrytis cinerea* o *Myceliophthora thermophila*, para mejorar la actividad de LPMO; y/o
 - en donde la celulosa procede de residuos lignocelulósicos o de papel de pulpa, tal como en donde la composición comprende o consiste esencialmente en subproducto lignocelulósico de biorrefinería tratado con LPMO.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde la concentración del ácido celobiónico o la sal del mismo es de 0,10 μ M a 1000 μ M, tal como de 0,10 μ M a 500 μ M, preferentemente de 0,10 μ M a 100 μ M, tal como de 0,10 μ M a 10 μ M.
9. El uso o método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde la concentración total de las celodextrinas, celodextrinas C1-oxidadas incluyendo el ácido celobiónico, celodextrinas C4-oxidadas y celodextrinas C1 y C4-oxidadas es de 0,10 μ M a 1000 μ M, tal como de 0,10 μ M a 500 μ M, preferentemente de 0,10 μ M a 100 μ M, tal como de 0,10 μ M a 10 μ M.
10. El uso o método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde la composición comprende celodextrinas, celodextrinas C1-oxidadas y celodextrinas C4-oxidadas en una relación molar de aproximadamente 4:5:1.
11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 10 o método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en donde:
 - se previene, controla o trata una infección vegetal por un patógeno vegetal;
 - el patógeno vegetal es un hongo o una bacteria, tal como un hongo o bacteria necrotrófico, tal como *Botrytis cinerea*, un hongo o bacteria hemibiotrófico, o un hongo o bacteria biotrófico, tal como *Pseudomonas syringae*;
 - la planta es una planta dicotiledónea, que preferentemente se selecciona a partir de las familias *Brassicaceae*, *Solanaceae* o *Rosaceae*, tales como *Arabidopsis thaliana*, col, tomate, vid, soja, manzana, pera o fresas, o en donde la planta es una planta monocotiledónea, que preferentemente se selecciona a partir de la familia *Gramineae*, tal como maíz, arroz, cebada o trigo; y/o
 - la puesta en contacto de la planta es a través de un órgano de la planta, preferentemente un órgano que se selecciona a partir de hojas, raíces y/o frutos o a través de semillas de la planta.

12. Una composición fitofarmacéutica que comprende ácido celobiónico o una sal fitofarmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador fitofarmacéuticamente aceptable que comprende uno o más agentes tensoactivos aniónicos, no iónicos, anfóteros o catiónicos, o una combinación de los mismos.

5 13. La composición fitofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la composición comprende 0,10 μM a 1000 μM , tal como de 0,10 μM a 500 μM , preferentemente de 0,10 μM a 100 μM , tal como de 0,10 μM a 10 μM , de ácido celobiónico o sal del mismo.

10 14. La composición fitofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde:

la composición adicionalmente comprende una o más celodextrinas; una o más celodextrinas C1-oxidadas o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas; una o más celodextrinas C4-oxidadas; y/o una o más celodextrinas C1 y C4-oxidadas, o una sal fitofarmacéuticamente aceptable de las mismas;

15 la composición adicionalmente comprende uno o más elicitores de la defensa vegetal adicionales, tales como un elicitador vegetal que se selecciona a partir de compuestos derivados de la pared celular de plantas u hongos, particularmente tal como un elicitador vegetal que se selecciona a partir del grupo que consiste en fragmentos de pectina, oligogalacturónidos, celobiosa, xiloglucano, β -1,3-glucano no ramificado, fragmentos de quitina, arabinosa, arabinano, ramnosa, homogalacturonano, ramnogalacturonano I y II, xilogalacturonano, almidón, y combinaciones de los mismos;

20 el grado de polimerización (DP) de dichas celodextrinas, celodextrinas C1-oxidadas, celodextrinas C4-oxidadas y celodextrinas C1 y C4-oxidadas es cada uno de manera independiente de 2 a 10, preferentemente de 2 a 5; dicho ácido celobiónico o dichas celodextrinas, celodextrinas C1-oxidadas, celodextrinas C4-oxidadas y celodextrinas C1 y C4-oxidadas son producidas por la descomposición de la celulosa por una o más polisacárido mono-oxigenasas líticas (LPMO), opcionalmente en donde:

25 por lo menos una de las una o más LPMO pertenece a la familia de actividad auxiliar (AA) 9, tal como una LPMO-AA9 proveniente de *Botrytis cinerea*, *Thielavia terrestris* o *Myceliophthora thermophila*; se utilizan una o más celobiosa deshidrogenasas (CDH), tal como una CDH proveniente de *Botrytis cinerea* o *Myceliophthora thermophila*, para mejorar la actividad de LPMO; y/o

30 la celulosa proviene de desperdicio lignocelulósico o de papel para pulpa, tal como en donde la composición comprende o consiste esencialmente en subproducto lignocelulósico de biorrefinería tratado con LPMO;

la concentración total de las celodextrinas, celodextrinas C1-oxidadas incluyendo el ácido celobiónico, celodextrinas C4-oxidadas y celodextrinas C1 y C4-oxidadas es de 0,10 μM a 1000 μM , tal como de 0,10 μM a 500 μM , preferentemente de 0,10 μM a 100 μM , tal como de 0,10 μM a 10 μM ; y/o

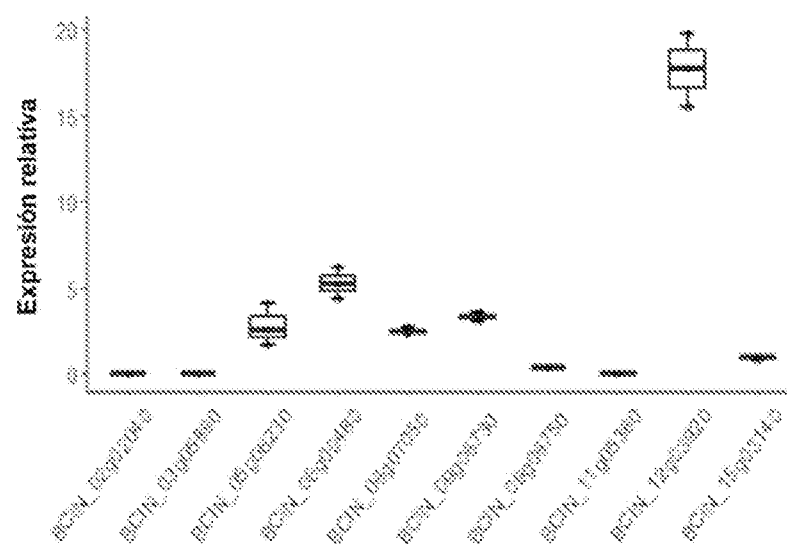
35 la composición comprende celodextrinas, celodextrinas C1-oxidadas y celodextrinas C4-oxidadas en una relación molar de aproximadamente 4:5:1.

15. La composición fitofarmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde el tensioactivo es un tensioactivo no iónico ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$) que tiene una cadena de óxido de polietileno hidrófilo con una media de 9,5 unidades de óxido de etileno y un grupo de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenilo, monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán, monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitán y/o 3-(2-metoxietoxi)propil-metil-bis(trimetilsililoxi)silano.

40

Fig. 1

A



B

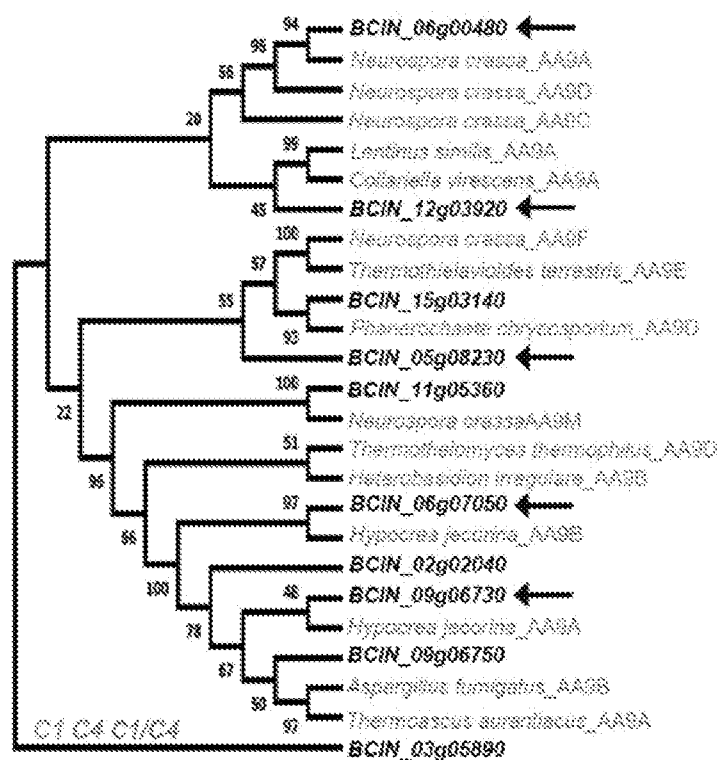
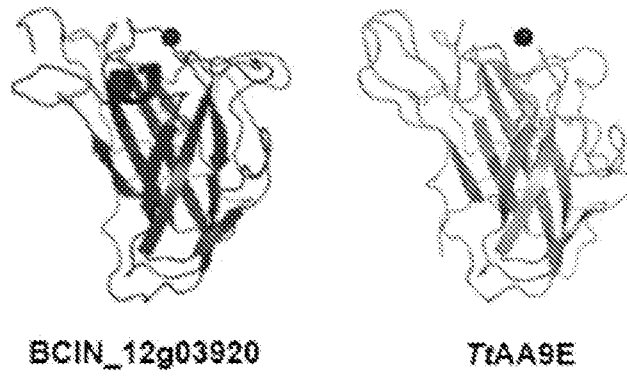


Fig. 1 (Continuación)

C



D

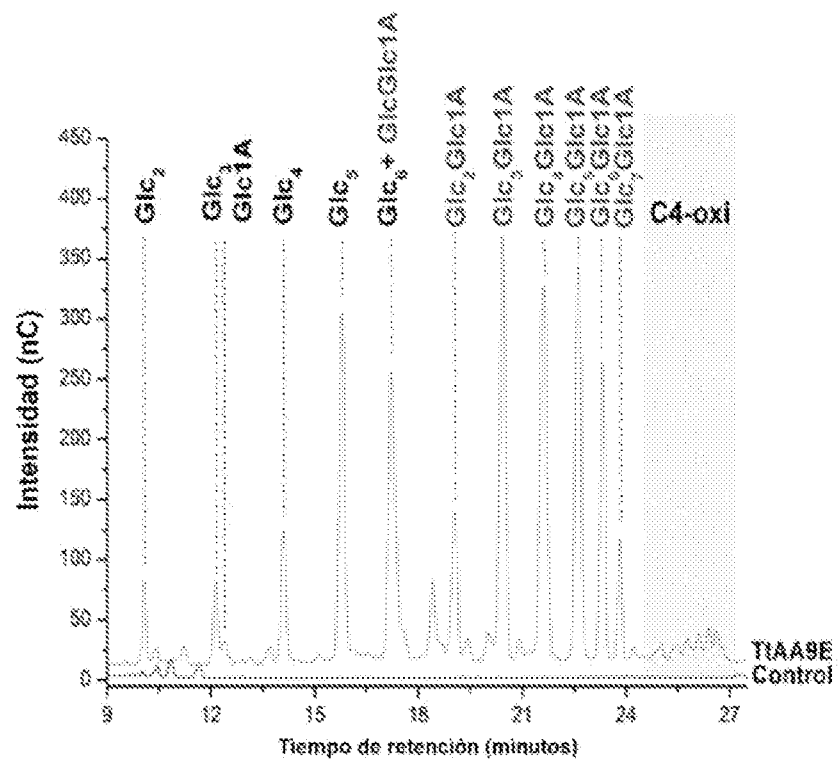


Fig. 2

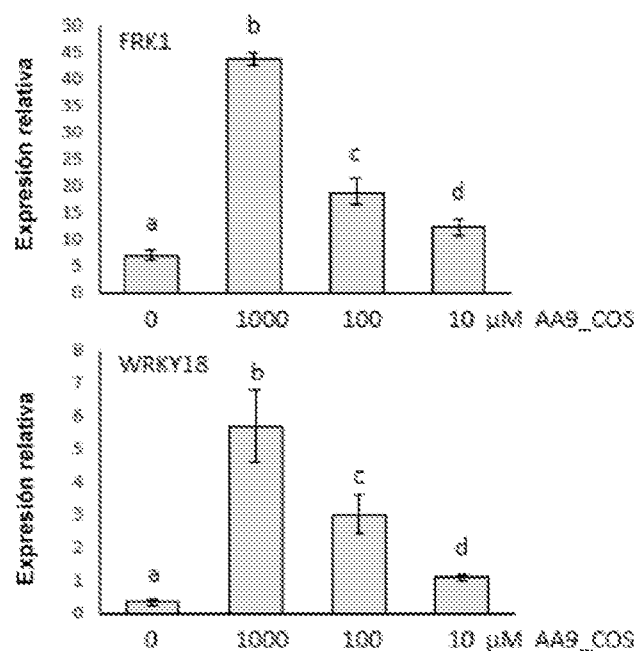


Fig. 4

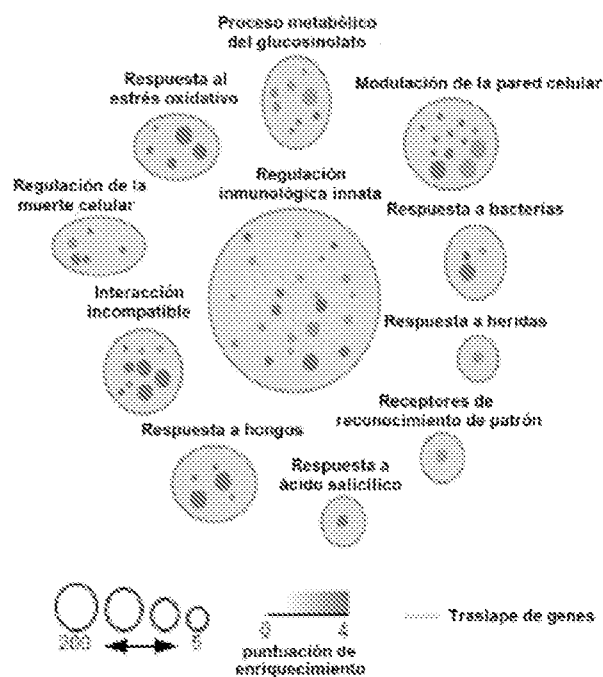


Fig. 3

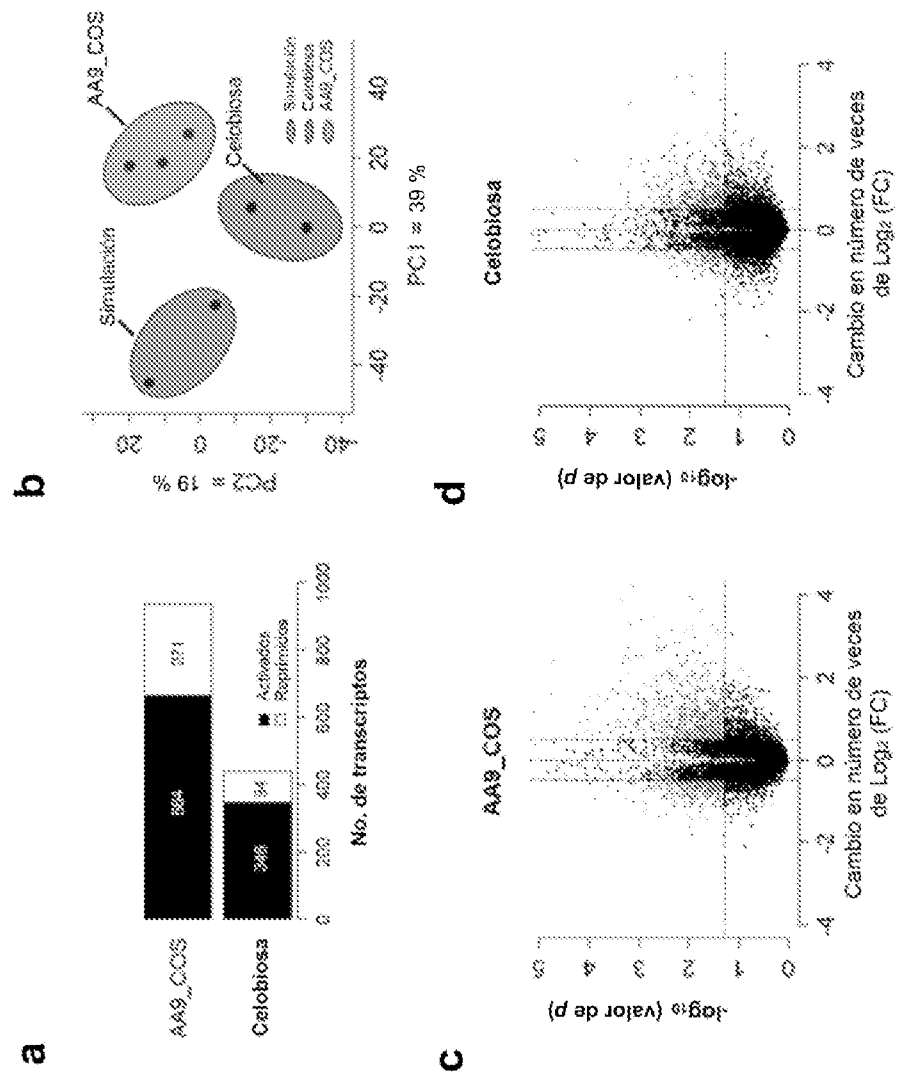


Fig. 6

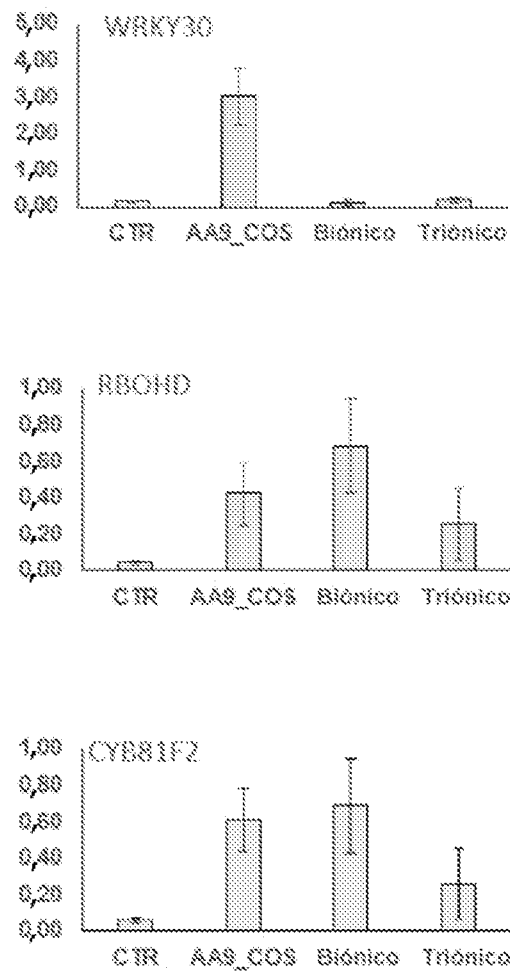


Fig. 7

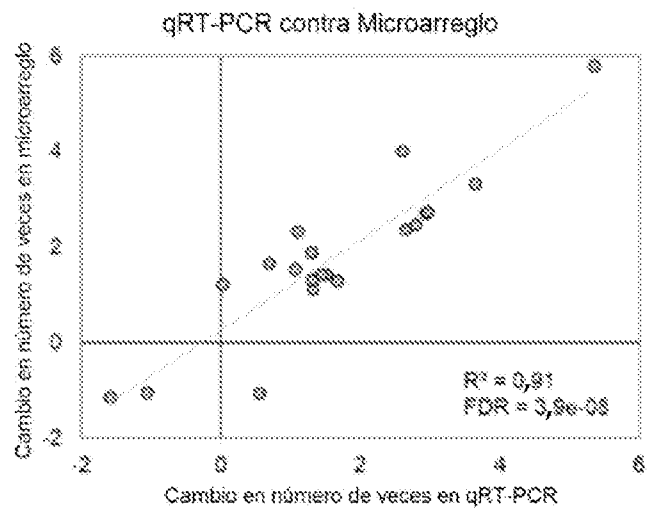
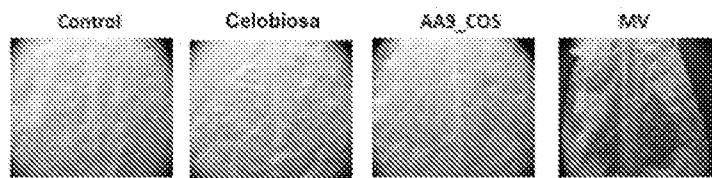
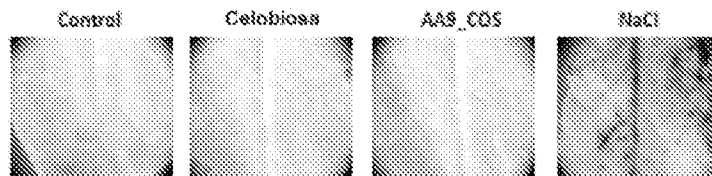


Fig. 8

a



b



c

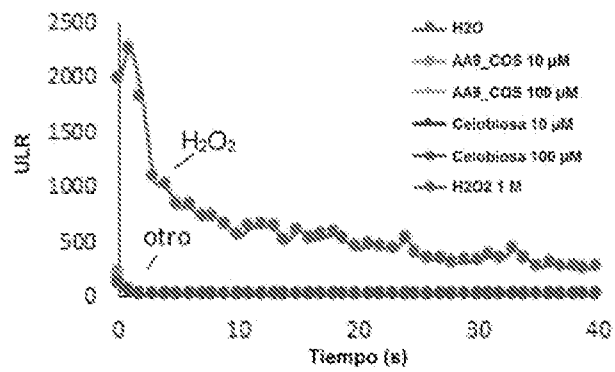


Fig. 9

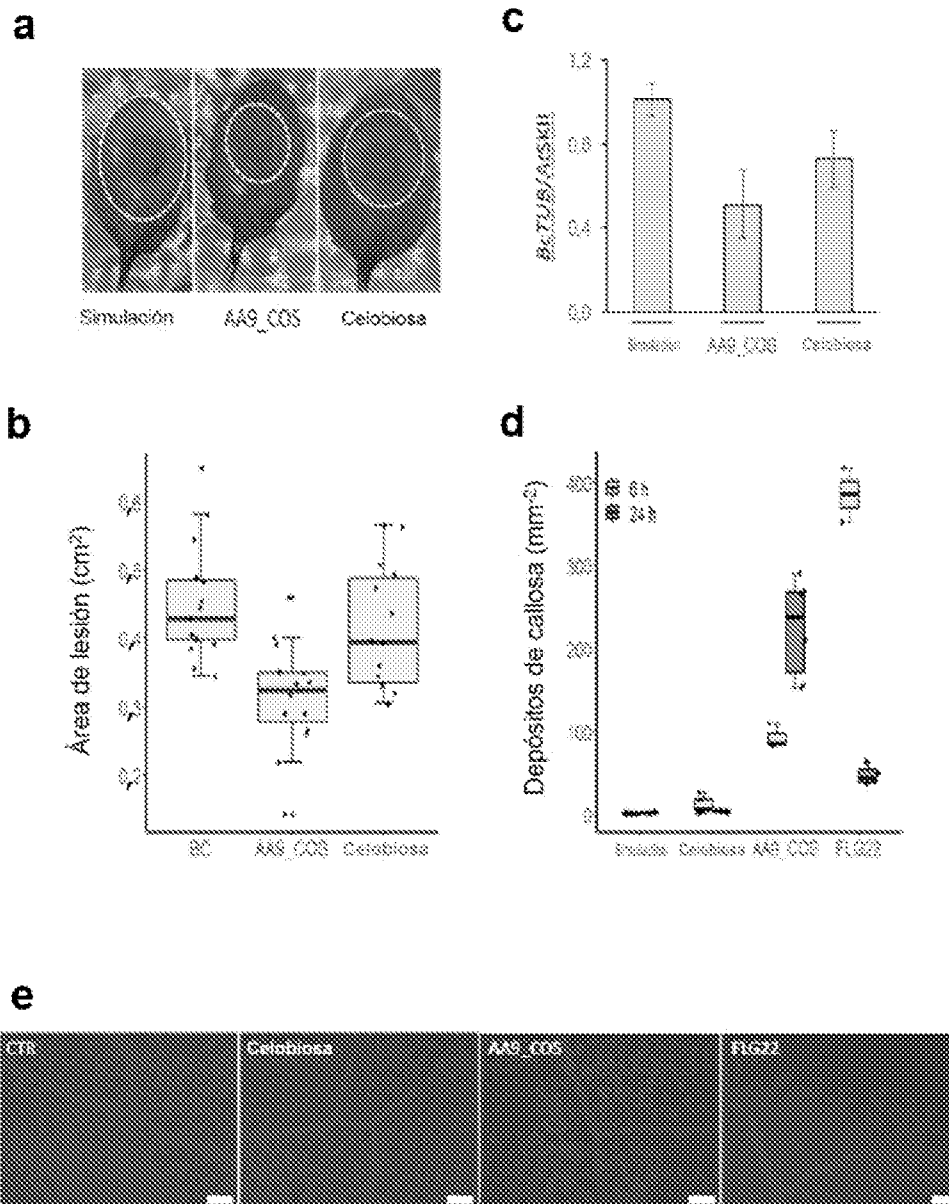
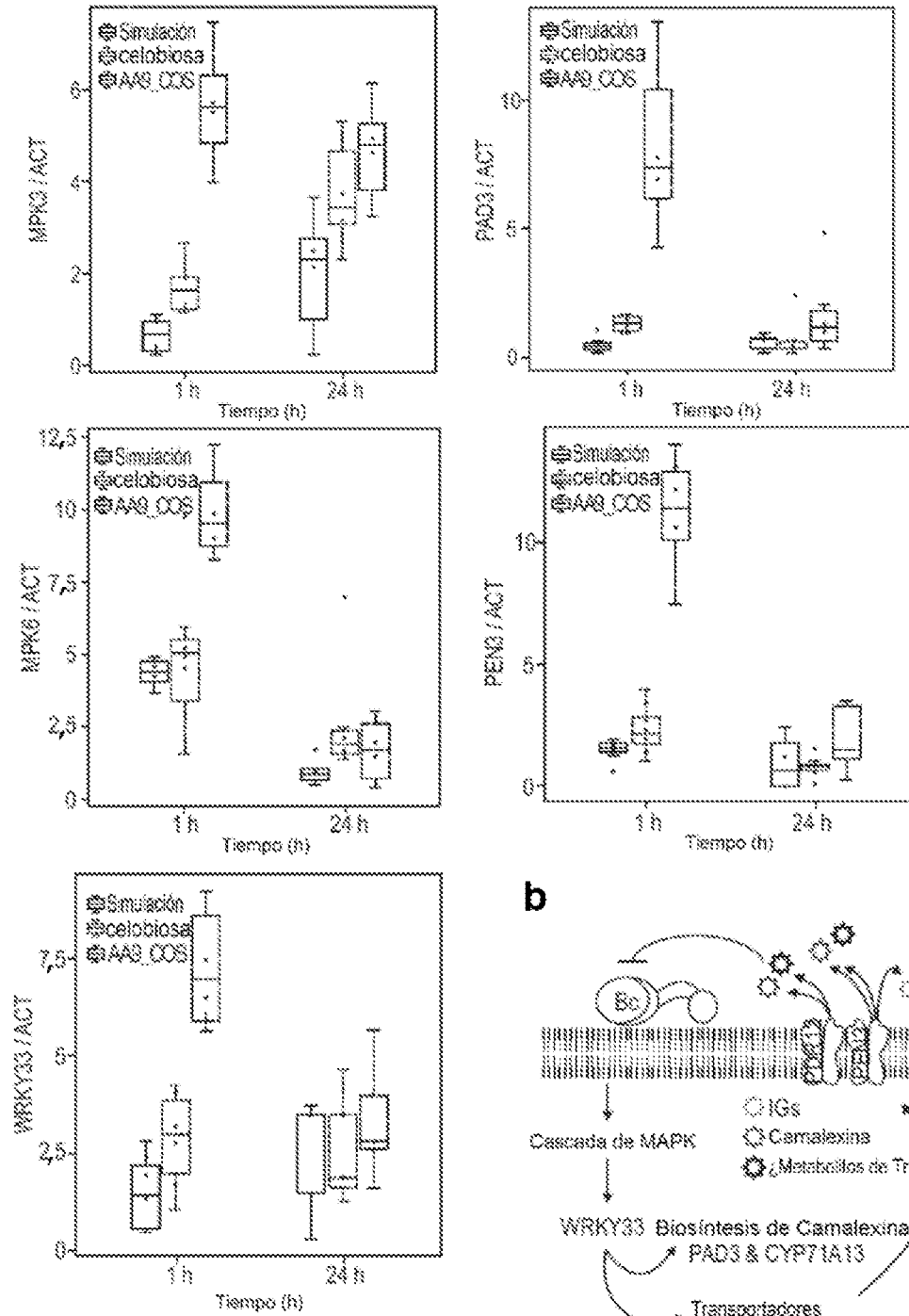


Fig. 10

a



b

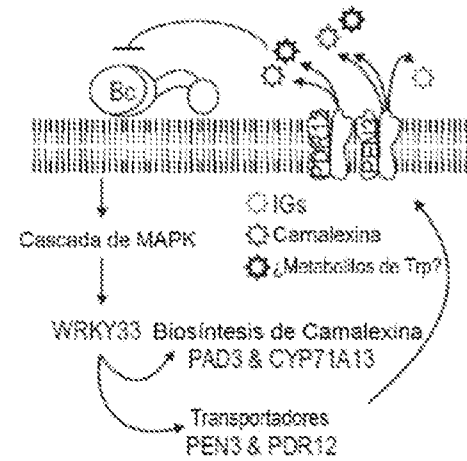


Fig. 10 (Continuación)

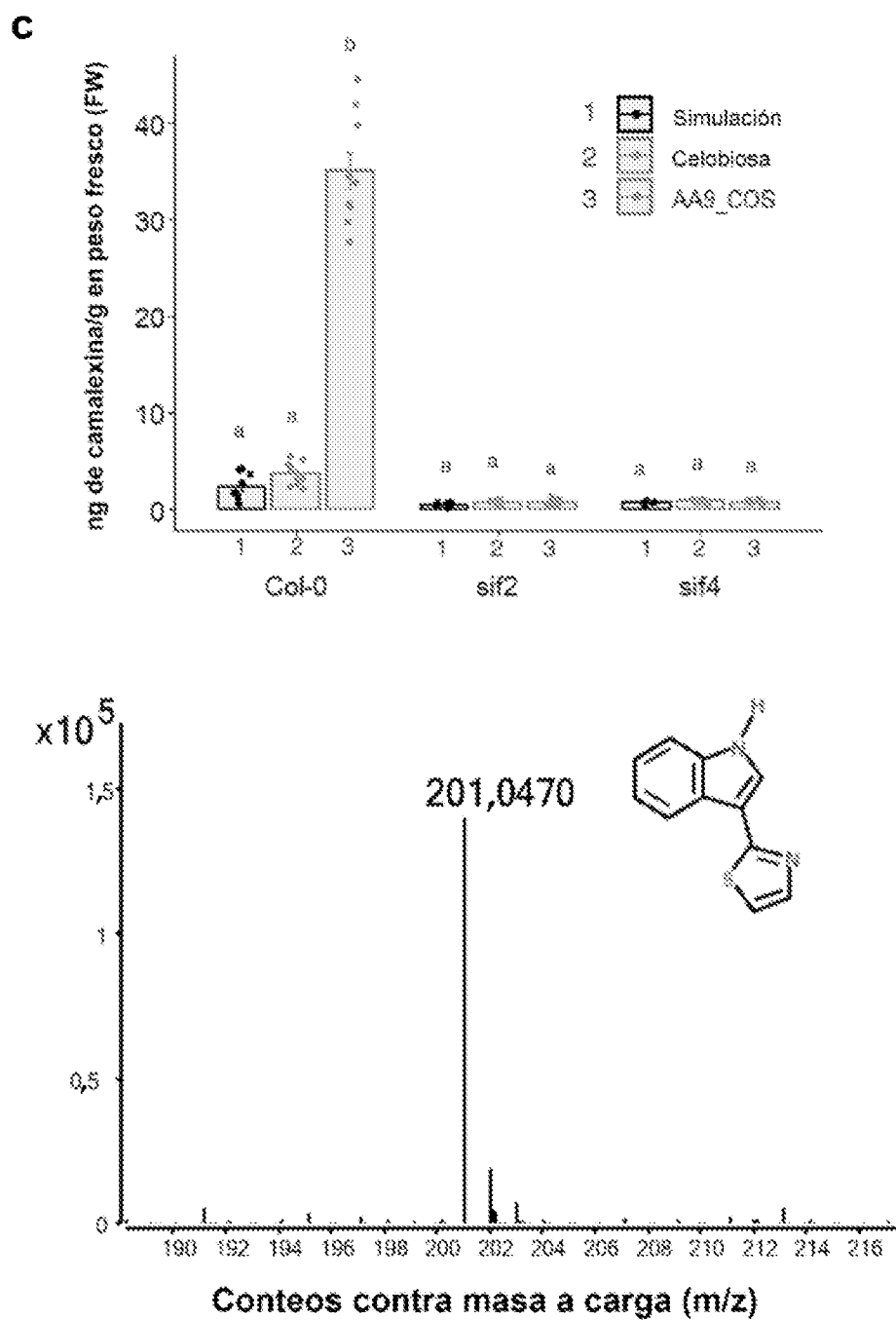


Fig. 10 (Continuación)

d

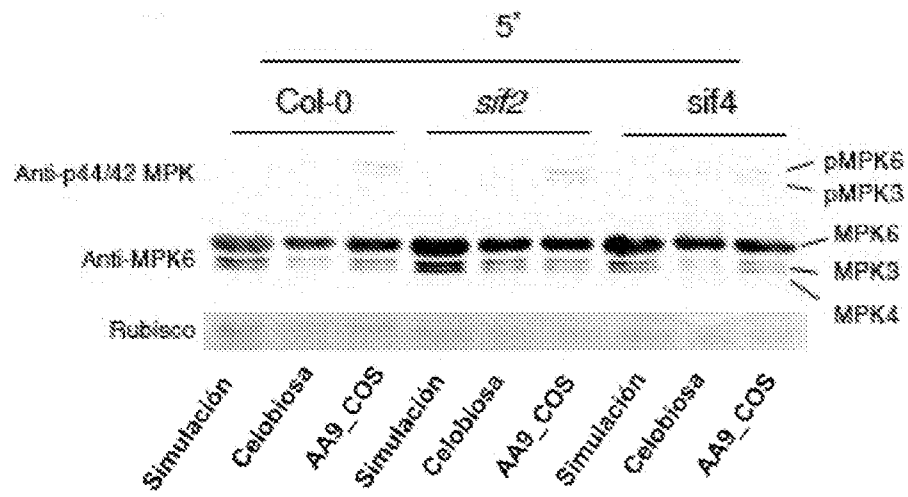


Fig. 11

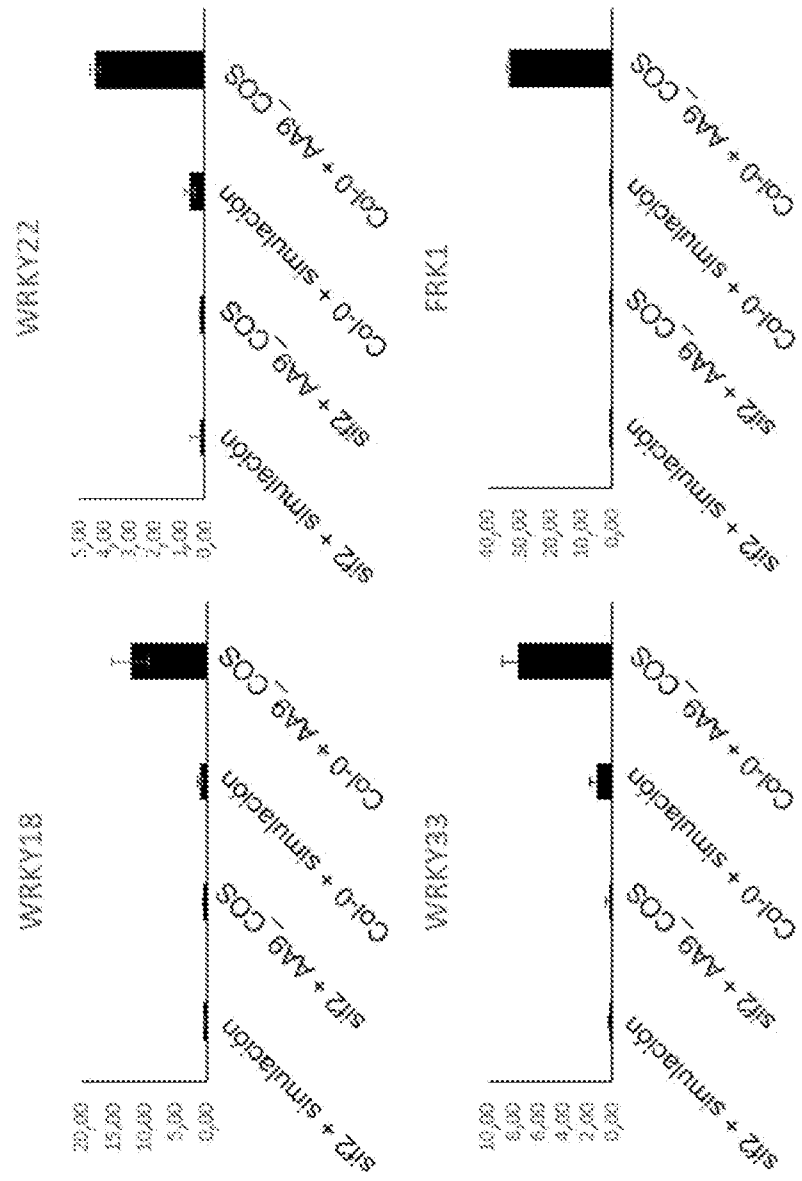


Fig. 12

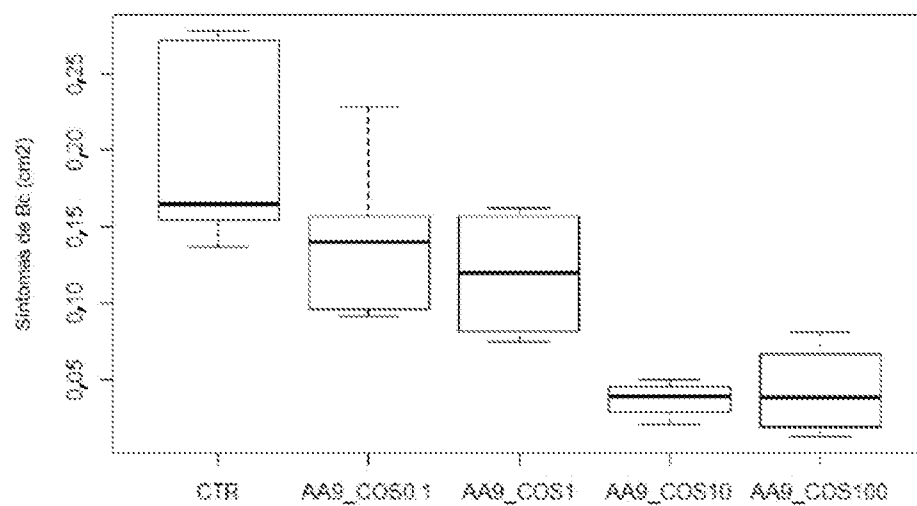


Fig. 13

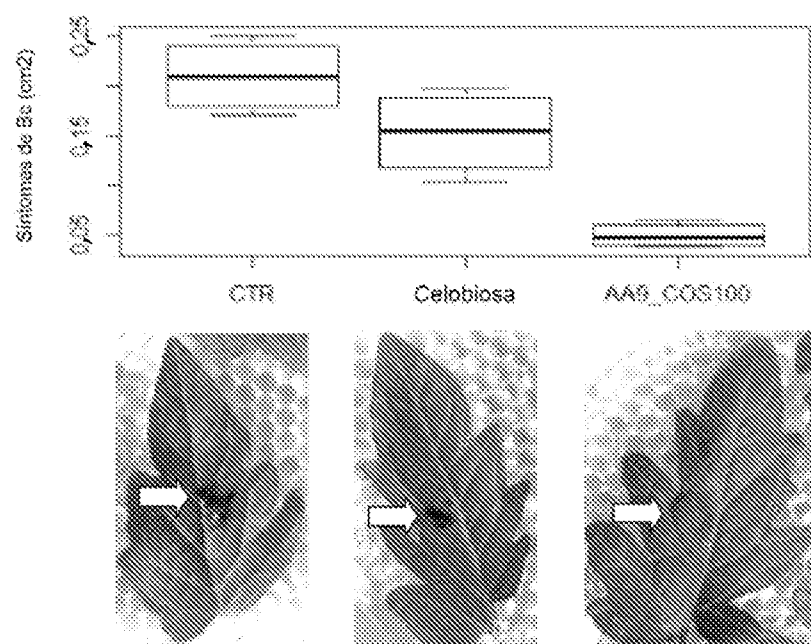


Fig. 14

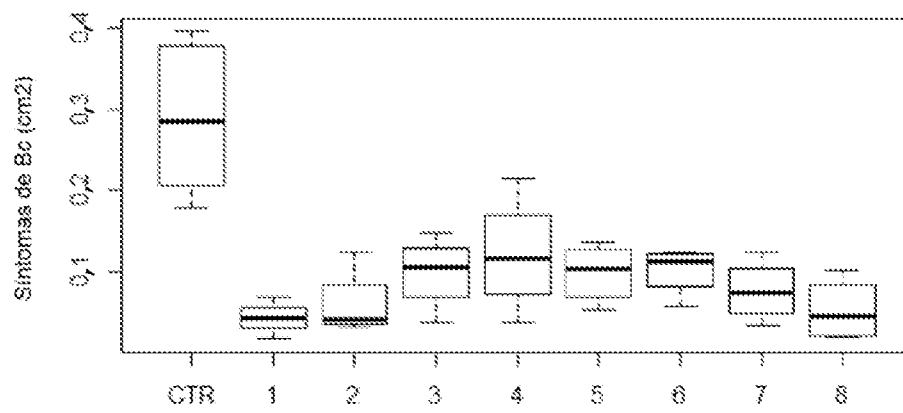


Fig. 15

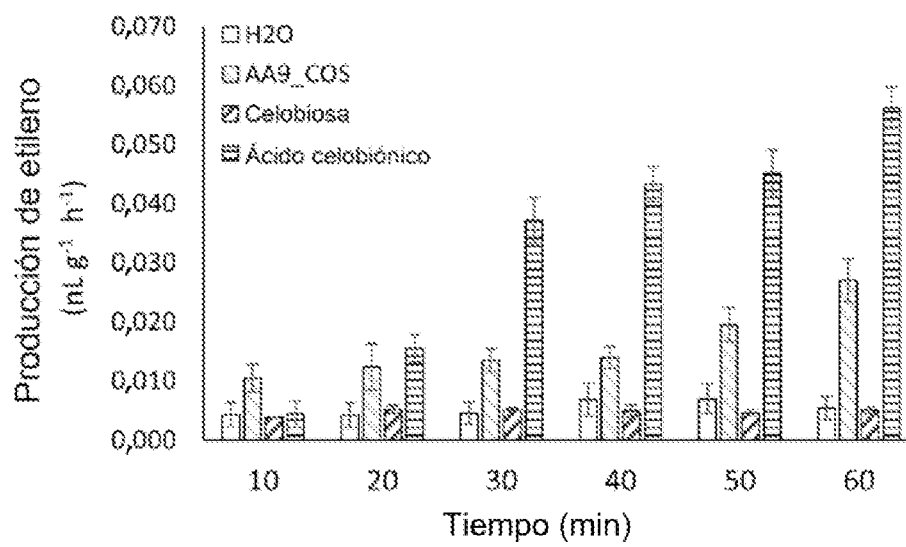


Fig. 16

