



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 099 030**

⑫ Número de solicitud: 9500290

⑬ Int. Cl.⁶: A01N 59/00

/(A01N 59/00

A01N 37:40

A01N 43:653)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **01.02.95**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.97**

Fecha de concesión: **26.11.97**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.01.98**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.01.98

⑲ Titular/es: **Universidad de Valladolid en su
representación el Vicerector de Investigación
Rafael Pedrosa Saez
Plaza de Santa Cruz, 8
47002 Valladolid, ES**

⑳ Inventor/es: **Girbés Juan, Tomás;
Rojo Rodríguez, M. Angeles y
López Carbajales, Mercedes**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Procedimiento artificial para inducir en la planta Beta vulgaris saac. (remolacha azucarera),
proteínas relacionadas con la patogénesis.**

㉓ Resumen:

Procedimiento artificial para inducir en la planta Beta vulgaris Sacc. (remolacha azucarera), proteínas relacionadas con la patogénesis.

Se describe un procedimiento para inducir de manera artificial la aparición entre otras de actividades enzimáticas glucanasas y quitinasas en las hojas de las plantas, en particular la de la remolacha azucarera (Beta vulgaris), consistente en la aplicación tópica por aspersión de una solución en agua de 5 mM de peróxido de hidrógeno, 5 mM de ácido salicílico, 4 mM de 3-amino-1,2,4-triazol o compuestos que como consecuencia de su degradación produzcan dicho peróxido.

La aplicación más inmediata del procedimiento es la del fortalecimiento de la resistencia natural de la planta tratada, en particular la de la remolacha (Beta vulgaris), a los patógenos fúngicos y virales y así prevenir la infección por dichos agentes de los cultivos de la planta tratada.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 099 030 B1

DESCRIPCION

Procedimiento artificial para inducir en la planta *Beta vulgaris* sacc. (remolacha azucarera), proteínas relacionadas con la patogénesis.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR -proteínas) con actividad enzimática de quitinasa y de β -(1,3)-glucanasas las cuales impiden la proliferación de los hongos fitopatogénicos en las plantas infectadas por ellos. Estas actividades enzimáticas se inducen también por infección de las plantas por virus vegetales. Por todo ello estas actividades enzimáticas están relacionadas con la resistencia de las plantas a la infección por hongos fitopatogénicos y por virus vegetales.

De forma más específica, la presente invención se refiere a la inducción artificial de proteínas relacionadas con la patogénesis, en particular las actividades enzimáticas quitinasa y β -(1,3)-glucanasa en la plantas, con especial aplicación a la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), con la finalidad de prevenir o aminorar la infección por hongos fitopatogénicos y virus vegetales, mediante la administración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o compuestos que en su degradación biológica o artificial den lugar a la aparición de peróxido de hidrógeno.

20 **Estado de la técnica**1.- *Respuesta molecular de las plantas a la infección por hongos fitopatogénicos y virus.*

La infección por hongos fitopatógenos y virus, la aplicación de ácido salicílico, etefon y la exposición a etileno de determinadas plantas provoca una respuesta relativamente rápida a nivel macromolecular consistente en la producción y deposición de compuestos tales como callosa, phytoalexinas con carácter antibiótico, diversas proteínas relacionadas con la patogénesis. (Bowles, Ann.Rev.Biochem. 59, 873-907 [1990]; Linthorst, Crit. Rev. Plant Sci. 10, 123 -150 [1991]; Van Loon, en "Plant-microbe interactions, molecular and genetic perspectives, eds. T.Kosuge y Nester, New York, Mac Millan; Boller, Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol. 5, 145-175 [1988]).

Entre las proteínas que se sintetizan en respuesta a la infección las hay que ejercen su actividad en el citoplasma celular, la pared celular y en espacio extracelular. Entre las proteínas extracelulares están las proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR; Bowles, Ann.Rev.Biochem. 59, 873-907 [1990]; Van Loon, en "Plant-microbe interactions, molecular and genetic perspectives, eds. T.Kosuge y Nester, New York, Mac Millan; Boller, Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol. 5, 145-175 [1988]). Existen cinco familias de proteínas PR que aparecen después de la infección de las plantas de tabaco con el virus del mosaico del tabaco (Bol y Van Kan, Microbiological Sciences 5, 47-52 [1988]).

Algunas de estas proteínas poseen actividad enzimática. Recientemente se ha descrito que algunas proteínas PR son quitinasas y β -(1,3)-glucanasas (Legrand, y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6750-6754 [1987]; Kauffmann, y cols., EMBO J. 6, 3209-3212 [1987]). Estas enzimas poseen carácter antifúngico frente a diversos hongos fitopatógenos (Logemann, y cols. Bio/technol. 10, 305-308 [1992]; Jach, y cols., Biopractice 1, 33-40 [1992]; Mauch, y cols., Plant Physiol 88, 936-942 [1988]), probablemente debido a que ambos tipos de enzimas degradan la pared celular de determinados hongos fitopatógenos lo que conlleva la inhibición de su crecimiento (Boller, Oxford Surv. Plant. Mol. Cell Biol. 5, 145-175 [1988]; Boller, y cols, Planta 157, 22-31 [1983]).

El efecto antifúngico de quitinasas y β -(1,3)glucanasas es potenciado por proteínas inactivadoras de ribosomas o RIPs (Logemann, y cols. Bio/technol. 10, 305-308 [1992]; Leah, y cols., J. Biol. Chem. 266, 1564-1573 [1991]). Las RIPs poseen además efecto antiviral tanto cuando se aplican tópicamente (Irvin J.D., Pharmacology Ther. 21, 371-387 [1992]) como cuando se expresan en plantas transgénicas convenientemente manipuladas para que expresen estas proteínas (Lodge, J.K. y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 7089-7093 [1993]).

2.- *Quitinasas*

La quitinasa es una enzima lítica capaz de degradar la quitina (poli-N-acetil-glucosamina) presente en la pared de numerosos patógenos fúngicos (Boller, y cols., Planta 157, 22 -31 [1983]). Las quitinasas de diversas especies de plantas comprenden formas ácidas y básicas (Linthorst y cols., Mol. Plant-Microbe Interact. 3, 252-258 [1990]; Dore y cols., Arch.Virol. 120, 97-107 [1991]). Ambas formas pueden indu-

cirse por la infección con agentes patogénicos y se encuentran también en plantas normales no infectadas (Linthorst y cols., Mol.Plant-Microbe Interact. 3, 252-258 [1990]; Dore y cols., Arch.Virol. 120, 97-107 [1991]).

5 La estructura y expresión de genes de quitinasas ha sido estudiada en numerosas plantas monocotiledoneas y dicotiledoneas. De la estructura de los genes de quitinasas emerge una clasificación en tres categorías (Shinshi, y cols., Plant Mol. Biol. 14, 357-368 [1990]). *Clase I*: isoformas básicas con un dominio N-terminal rico en cisteína y un dominio catalítico altamente conservado. *Clase II*: como la clase I pero sin dominio N-terminal rico en cisteína. *Clase III*: isoformas que no muestran homología con las
10 otras dos clases pero son homólogas a las formas ácidas de pepinillo (*Cucumis sativus*) y *Arabidopsis thaliana*.

La expresión de los genes de las quitinasas está regulada de una manera muy compleja. En muchos casos tanto las isoformas básicas como la ácidas son multigénicas y su expresión esta bajo regulación del
15 desarrollo (Lotan y cols., Plant Cell, 1, 881-887 [1989]). Las formas ácidas son de localización apoplástica mientras que las básicas se localizan en la vacuola central (Shinshi, y cols., Plant Mol. Biol. 14, 357-368 [1990]).

3.- β -(1,3)-glucanasas

20 Las β -(1,3)-glucanasas de plantas son endoglucanasas que degradan β -(1,3)-glucanos (callosa) presentes en la pared de diversas estructuras vegetales tales como los tubos de polen, las paredes celulares del endospermo, y como depósito que se forma en respuesta a agresiones mecánicas, microbianas y "estress" fisiológico (Fincher y Stone, Encycl. Plant Physiol., N. S., 13 B, 68-132 [1981]; Simmons y cols., Plant
25 Mol. Biol. 18, 33-45 [1992]).

Las β -(1,3)-glucanasas son capaces de degradar el β -(1,3)-glucano presente en las paredes de hongos fitopatogénicos y presentan un efecto sinérgico con las quitinasas y las proteínas inactivadoras de ribosomas o RIPs (Logemann y cols., Bio/technol. 10, 305-308 [1992]; Leah y cols., J. Biol. Chem. 266,
30 1564-1573 [1991]). Este hecho junto a que ambos tipos de enzimas parecen expresarse de manera coordinada en respuesta a la infección por patógenos ha llevado a proponer un papel de agentes de defensa inducibles por la infección para ambos tipos de enzima (Wessels y cols., Encycl. Plant Physiol., N. S., 13 B, 352-394 [1981]).

35 En tabaco, que es la planta modelo mejor estudiada para este propósito, se han encontrado dos tipos de glucanasas, básicas y ácidas. Las formas más estudiadas son las básicas que se inducen por patógenos y etileno, están reguladas por el desarrollo y se localizan en la vacuola central de la célula (Côté y cols., Mol.Plant-Microbe Interact. 4, 173-181 [1991]). Las isoformas ácidas (PR-2, PR-N, PR-O y PR-35) son inducidas también por patógenos y se localizan en el espacio apoplástico (Simmons y cols., Plant Mol.
40 Biol. 18, 33-45 [1992]).

4.- Inducción de la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) por la infección por virus y hongos fitopatogénicos (colectivamente, patógenos).

45 El daño tisular promovido por pestes y patógenos conduce a un incremento en la producción de ácido 1-aminociclopropano -1-carboxílico que posteriormente se transforma en etileno (Enyedi y cols., Cell, 70, 879-886 [1992]). Etileno se difunde en el aire e induce la producción de varias proteínas PR. (Enyedi y cols., Cell, 70, 879-886 [1992]). El mismo efecto se consigue con etephon, un compuesto que libera etileno (Brederode y cols., Plant Mol.Biol. 17, 1117-1125 [1991]; Memelink y cols., Plant Mol. Biol. 14, 119-126
50 [1990]).

Etileno parece ser un intermedio del denominado sistema SAR, sistema de resistencia sistémico (systemic acquired resistance; Enyedi y cols., Cell, 70, 879-886 [1992]), que se dispara al ser infectada una planta por un patógeno y que se manifiesta tanto en la parte de la planta infectada como en la no infectada. La
55 inducción del SAR provoca la producción de cinco familias de proteínas PR (Linthorst Crit.Rev.Plant Sci 10, 123-150 [1991]), dos de las cuales son las quitinasas y β (1,3)-glucanasas.

El ácido salicílico es también un inductor de la expresión de las proteínas PR, y se produce a partir del ácido cinámico en el entorno de las lesiones necróticas como consecuencia de la denominada respuesta
60 hipersensible a patógenos (Enyedi y cols., Cell, 70, 879-886 [1992]).

Muy recientemente se ha descrito que la inyección en la planta, en el espacio extracelular de hojas

de tabaco de sustancias tales como ácido salicílico, H_2O_2 , 3-amino-1,2,4-triazol, glicolato o paraquat induce la expresión de los genes de las proteínas PR-1 cuya actividad funcional es desconocida (Chen y cols., Science 262, 1883-1886 [1993]).

5 Descripción detallada de la invención

El procedimiento consiste en un tratamiento de las plantas, en particular de las de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* Sacc.), con una solución diluida de H_2O_2 en dos o más etapas. En la primera, se aplica la solución por aspersión de manera que moje las hojas. Después de 24 h se realiza un segundo tratamiento idéntico al primero. Caso de no ser suficientes estos dos tratamientos pueden realizarse otros con intervalos de 24 h. Aunque el tratamiento es preferible que se realice por la noche para forzar la máxima apertura de los estomas y así facilitar al máximo la entrada del producto en la planta, puede realizarse también de día.

Para demostrar la inducción de proteínas de defensa, a los cinco días del primer tratamiento se analizan las hojas de remolacha en actividad quitinasa y β -(1,3)-glucanasa. El objeto del tratamiento tópico por aspersión con H_2O_2 es preparar a la planta para que exprese las actividades enzimáticas antifúngicas quitinasas y β -(1,3)-glucanasas, y que se frene el proceso de infección por patógenos fúngicos. Se trata pues de inmunizar a la planta frente a ulteriores infecciones por hongos fitopatogénicos. Por ello, esta sustancia química puede utilizarse para el control no contaminante del medio ambiente, de las infecciones de las plantas y en particular de la remolacha azucarera por hongos fitopatogénicos.

Modos de realizar la invención

El modo de analizar los resultados de la aplicación del procedimiento consiste en lo siguiente:

a.- Procedimiento para obtener las plantas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*)

La semilla de *Beta vulgaris* mongermen sometida a un tratamiento de depildoración, fue depositada aproximadamente a 3 cm de la superficie de la maceta. En el fondo de la maceta se colocó una capa fina de arena, después se rellenó la maceta con mantillo y por último se puso una capa fina de un sólido desecante (Sanicat: Sepiolite, Tolsa). Estos materiales de relleno se sometieron previamente a esterilización en autoclave.

Las macetas se colocaron en una habitación sometidas a luz blanca durante 16 h a la temperatura de 20-23°C, con riego constante.

b.- Obtención del extracto protéico crudo de plantas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*)

Los extractos crudos de hojas de plantas de remolacha azucarera se obtienen como se describe a continuación. Las hojas de *Beta vulgaris* (remolacha azucarera) fueron trituradas y extraídas con 2 volúmenes respectivamente de 0.1 M de acetato de sodio (pH 4), durante toda la noche con agitación a 4°C. La pasta resultante se centrifuga a 13000 rpm a 0°C y el sobrenadante obtenido es lo que llamamos extracto crudo.

c.- Análisis de la actividad quitinasa de hojas de las plantas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*)

La actividad quitinasa se ensaya midiendo la N-acetilglucosamina liberada utilizando CM-quitina-RBV (carboximetil-quitina ligada al colorante azul brillante de remazol) como sustrato. La CM-quitina-RBV se prepara de acuerdo al procedimiento de Wirth y Wolf (Wirth, S.J. and Wolf, A. J. Microbiol. Methods 12, 197-205 [1990]) y se repurifica con HCl (19.6 ml del 37% para 100 ml de chitina) durante 10 min a 0°C, para disminuir la adsorbancia del blanco. La mezcla de reacción de 250 l contiene 50 mM de acetato de sodio (pH 5), 240 μ g/ml de CM-Chitin-RBV y varios volúmenes de solución enzimática. Después de 60 min de incubación a 37°C, se para la reacción añadiendo 62.5 μ l de HCl 1 M. La mezcla se deja 10 min a 0°C y para eliminar la quitina no digerida se centrifuga 6 min a 13000 rpm a 4°C. La N-acetilglucosamina liberada se determina por adsorbancia a 550 nm.

El tratamiento con solución de peróxido de hidrógeno provoca el incremento en la actividad quitinasa como se observa en las tablas 1 y 2. En ellas se detallan la media de las unidades de absorbancia, correspondientes a 3 experimentos, de los extractos crudos de las hojas de las plantas de remolacha azucarera sometidas a los diferentes tratamientos.

TABLA 1

Actividad quitinasa obtenida en extractos crudos de hojas jóvenes (3 meses) de remolacha azucarera (Beta vulgaris)

5	Tratamiento con:				
	Extracto crudo ($\mu\text{g/ml}$)	nada	Acido Salicílico	H ₂ O ₂	Amino-triazol
10	0.04	0.015 $\pm$ 0.000	0.012 $\pm$ 0.005	0.040 $\pm$ 0.007	0.052 $\pm$ 0.002
	0.4	0.034 $\pm$ 0.011	0.019 $\pm$ 0.002	0.049 $\pm$ 0.021	0.054 $\pm$ 0.003
	1.0	0.043 $\pm$ 0.005	0.033 $\pm$ 0.011	0.083 $\pm$ 0.015	0.111 $\pm$ 0.017
	2.0	0.042 $\pm$ 0.011	0.075 $\pm$ 0.007	0.081 $\pm$ 0.014	0.140 $\pm$ 0.008
15	4.0	0.082 $\pm$ 0.006	0.176 $\pm$ 0.026	0.149 $\pm$ 0.012	0.219 $\pm$ 0.033
	10.0	0.116 $\pm$ 0.004	0.252 $\pm$ 0.031	0.211 $\pm$ 0.007	0.255 $\pm$ 0.011

TABLA 2

20 *Actividad quitinasa obtenida en extractos crudos de hojas maduras (9 meses) de remolacha azucarera (Beta vulgaris)*

	Tratamiento con:				
25	Extracto crudo ($\mu\text{g/ml}$)	Nada	Acido Salicílico	H ₂ O ₂	Amino-Triazol
	0.04	0.040 $\pm$ 0.012	0.027 $\pm$ 0.011	0.032 $\pm$ 0.0170	0.031 $\pm$ 0.003
	0.4	0.037 $\pm$ 0.003	0.050 $\pm$ 0.018	0.103 $\pm$ 0.0110	0.076 $\pm$ 0.008
30	1.0	0.083 $\pm$ 0.002	0.135 $\pm$ 0.032	0.162 $\pm$ 0.0230	0.099 $\pm$ 0.025
	2.0	0.094 $\pm$ 0.009	0.185 $\pm$ 0.031	0.209 $\pm$ 0.025	0.112 $\pm$ 0.007
	4.0	0.120 $\pm$ 0.019	0.217 $\pm$ 0.037	0.220 $\pm$ 0.022	0.180 $\pm$ 0.015
	10.0	0.187 $\pm$ 0.025	0.275 $\pm$ 0.062	0.284 $\pm$ 0.032	0.218 $\pm$ 0.008

35 d.- *Análisis de la actividad β -(1,3)-glucanasa de las plantas de remolacha azucarera (Beta vulgaris)*

La actividad β -(1,3)-glucanasa se ensaya midiendo el azúcar liberado utilizando laminarina como sustrato. La mezcla de reacción de 50 μl contiene 0.1 M de acetato de sodio (pH 5.2), 1 mg/ml de laminarina y concentraciones variables de extracto protéico crudo. Después de 30 min de incubación a 37°C se añaden 50 μl del reactivo alcalino de cobre (Ashwell, G., Methods Enzymol. 3, 73-105 [1957]) y se incuba la mezcla durante 15 min a 100°C. Una vez fría la mezcla de reacción se añaden 50 μl del reactivo cromogénico de Nelson (Nelson y cols., J. Biol. Chem. 153, 375-380 [1944]) y se mide la absorbancia a 660 nm. En cada medida se restó un blanco que no lleva el sustrato.

45 El tratamiento con solución de peróxido de hidrógeno provoca el incremento en la actividad β -(1,3)-glucanasa como se observa en las tablas 3 y 4. En ellas se detallan la media de las unidades de absorbancia, correspondientes a 3 experimentos, de los extractos crudos (EC) de las hojas de las plantas de remolacha azucarera sometidas a los diferentes tratamientos.

50

55

60

TABLA 3

*Actividad β -(1,3)-glucanasa obtenida en extractos crudos de hojas jóvenes (3 meses) de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*)*

Extracto Crudo ($\mu\text{g/ml}$)	Tratamiento con:			
	nada	Acido Salicílico	H ₂ O ₂	Amino-triazol
5.0	0.027 $\pm$ 0.027	0.000 $\pm$ 0.000	0.068 $\pm$ 0.049	0.000 $\pm$ 0.000
20.0	0.041 $\pm$ 0.023	0.095 $\pm$ 0.095	0.013 $\pm$ 0.013	0.013 $\pm$ 0.013
100.0	0.054 $\pm$ 0.054	0.218 $\pm$ 0.119	0.341 $\pm$ 0.098	0.259 $\pm$ 0.134
200.0	0.109 $\pm$ 0.109	0.656 $\pm$ 0.205	1.599 $\pm$ 0.184	0.328 $\pm$ 0.268

TABLA 4

*Actividad β -(1,3)-glucanasa obtenida en extractos crudos de hojas maduras (9 meses) de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*)*

Extracto crudo ($\mu\text{g/ml}$)	Tratamiento con:			
	nada	Acido Salicílico	H ₂ O ₂	Amino-triazol
5.0	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.143 $\pm$ 0.143	0.020 $\pm$ 0.020
20.0	0.000 $\pm$ 0.000	0.005 $\pm$ 0.005	0.000 $\pm$ 0.000	0.020 $\pm$ 0.005
100.0	0.000 $\pm$ 0.000	0.018 $\pm$ 0.005	0.225 $\pm$ 0.100	0.012 $\pm$ 0.012
200.0	0.000 $\pm$ 0.000	0.020 $\pm$ 0.001	0.615 $\pm$ 0.000	1.270 $\pm$ 0.246

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento artificial para inducir en la planta Beta vulgaris Sacc. (remolacha azucarera), proteínas relacionadas con la patogénesis que consiste en realizar dos o más aplicaciones tópicas por aspersión de una solución en agua de 5 mM de peróxido de hidrógeno, 5 mM de ácido salicílico, 4 mM de 3-amino-1,2,4-triazol o compuestos que como consecuencia de su degradación produzcan dicho peróxido, durante dos o más días con intervalos de 24 h, pudiéndose llevar a cabo con luz u oscuridad.

2. Procedimiento artificial para inducir en la planta Beta vulgaris Sacc. (remolacha azucarera), proteínas relacionadas con la patogénesis, según Reivindicación 1, **caracterizado** por que desencadena la producción de actividades β -(1,3) -glucanasas.

3. Procedimiento artificial para inducir en la Beta vulgaris Sacc. (remolacha azucarera), proteínas relacionadas con la patogénesis, según Reivindicación 1, **caracterizado** por que desencadena la producción de actividades quitinasas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 099 030
⑫ N.º solicitud: 9500290
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 01.02.95
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: A01N 59/00 // (A01N 59/00, 43:653, 37:40)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ROUSSEAU-LIMOUZIN M. et al. "Induction of chitinases, 1,3-beta-glucanases and other pathogenesis-related proteins in sugar beet leaves upon infection with Cercospora beticola". PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY. Mar-Apr 1991, Vol. 29, nº 2. Páginas 105-117	
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:		
Fecha de realización del informe 28.02.97	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/1