

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 386**

21 Número de solicitud: 201730685

51 Int. Cl.:

**A01N 31/02** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22

Fecha de presentación:

11.05.2017

43

Fecha de publicación de la solicitud:

11.07.2017

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

26.09.2017

Fecha de la concesión:

23.02.2018

45

Fecha de publicación de la concesión:

02.03.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA  
(50.0%)**

**Servicio de Promoción y Apoyo a la  
Investigación, la Innovación y la Transferencia,  
Edificio Nexus (6G) - 3ª planta, Camí de Vera, s/n  
46022 Valencia ES y  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LISON PARRAGA, María Purificación;  
LÓPEZ GRESA, María Pilar;  
RODRIGO BRAVO, Ismael y  
BELLES ALBERT, José María**

74 Agente/Representante:

**MALDONADO JORDAN, Julia**

54

**Título: USO DE UN COMPUESTO PARA LA PROTECCIÓN DE PLANTAS MEDIANTE CIERRE ESTOMÁTICO Y MÉTODO DE PROTECCIÓN DE PLANTAS MEDIANTE CIERRE ESTOMÁTICO QUE COMPRENDE APLICAR A LAS PLANTAS DICHO COMPUESTO**

57

Resumen:

La presente invención se refiere al campo de la protección de plantas mediante cierre estomático, y más concretamente a un compuesto específico para su uso en la protección de plantas mediante cierre estomático, al uso de dicho compuesto así como a una composición que comprende el compuesto.

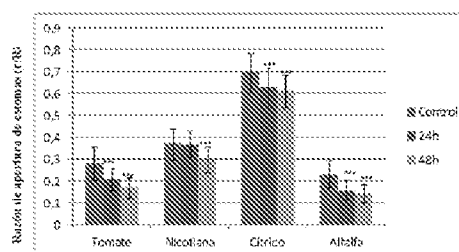


FIG. 4

ES 2 623 386 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

**DESCRIPCIÓN**

USO DE UN COMPUESTO PARA LA PROTECCIÓN DE PLANTAS MEDIANTE CIERRE ESTOMÁTICO Y MÉTODO DE PROTECCIÓN DE PLANTAS MEDIANTE CIERRE ESTOMÁTICO QUE COMPRENDE APLICAR A LAS PLANTAS DICHO

COMPUESTO

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general al campo de protección de plantas frente a estreses de tipo biótico (tales como infecciones) y abiótico (tales como  
10 sequía) mediante cierre estomático.

Antecedentes de la invención

Las plantas son organismos que se encuentran expuestos a multitud de agentes estresantes tanto bióticos como  
15 abióticos. Dado que son organismos sésiles han desarrollado mecanismos de adaptación y defensa para protegerse del entorno hostil que las rodea.

En lo referente al estrés biótico causado por los microorganismos, cabe destacar que las plantas se defienden  
20 en su entorno de un elevado número de patógenos tales como bacterias, hongos, virus, viroides, etc. Un patógeno de plantas es un organismo que completa parte o la totalidad de su ciclo vital creciendo en o sobre algún tejido de la misma, provocando a ésta un perjuicio. La definición de patógeno  
25 queda restringida a microorganismos, excluyendo a los insectos, a pesar de que las heridas que éstos causan en las plantas también activan respuestas defensivas, en ocasiones similares a las que producen los patógenos.

A pesar de estos numerosos ataques, debido a las armas  
30 defensivas que poseen las plantas, pocos acaban causando enfermedad. En concreto, en respuesta a dichos ataques o estreses bióticos las plantas sintetizan diferentes proteínas de defensa y metabolitos secundarios. Estos compuestos pueden ejercer diferentes funciones de defensa, es decir, pueden actuar como agentes antioxidantes, agentes antibacterianos o

antifúngicos, o funcionar como metabolitos de defensa indirectos activando la respuesta defensiva de la planta.

Algunos compuestos orgánicos volátiles (COV) pertenecen a este grupo de moléculas. En efecto, las plantas sintetizan una gran diversidad de compuestos orgánicos volátiles que facilitan las interacciones con su medio ambiente, desde la atracción de polinizadores y dispersores de semillas hasta la defensa contra parásitos, herbívoros y patógenos. Las propiedades físico-químicas de estos compuestos les permiten cruzar libremente las membranas celulares y liberarse en el ambiente circundante. Actualmente, al menos 1700 compuestos volátiles han sido identificados de más de 90 familias de plantas, constituyendo aproximadamente el 1% de todos los metabolitos secundarios de plantas conocidos.

Aunque en menor medida, también se han descrito emisiones de COV en una interacción planta-patógeno, es decir, en plantas que presentan infecciones por bacterias, virus u hongos. Muchas oxilipinas son conocidas por exhibir propiedades antifúngicas y antimicrobianas que debilitan y/o destruyen al patógeno. Por ejemplo, el compuesto antimicrobiano ácido colneleico se acumula rápidamente en las hojas de patata infectadas por hongos o virus (Blée, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*, 7(7), págs. 315-322). En el caso de COV inducidos por bacterias, los estudios realizados hasta el momento son escasos. Se ha detectado la acumulación de COV en plantas de pimiento infectadas con la bacteria *Xanthomonas* (Cardoza, Y. y Tumlinson, J. (2006). Compatible and Incompatible *Xanthomonas* Infections Differentially Affect Herbivore-Induced Volatile Emission by Pepper Plants. *Journal of Chemical Ecology*, 32(8), págs. 1755-1768). Asimismo, se ha descrito la inducción de distintos COV en plantas de tabaco infectadas por la bacteria *Pst* en una infección de tipo

incompatible. Algunos de los compuestos inducidos son monoterpenos, sesquiterpenos y otros compuestos volátiles como el MeSA y el indol (Huang, J., Cardoza, Y., Schmelz, E., Raina, R., Engelberth, J. y Tumlinson, J. (2003).  
5 Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta*, 217(5), págs. 767-775). El MeSA fue la primera señal química que se demostró que era capaz de ser traslocada en plantas de tabaco desde el sitio de la  
10 infección a otros tejidos de la planta, así como de ser transmitida a través del aire desde plantas infectadas a plantas sanas. Por otra parte, se ha descrito que el compuesto volátil (*E*)- $\beta$ -cariofileno emitido por *Arabidopsis thaliana* inhibe el crecimiento bacteriano de *Pst*.  
15 Recientemente, se ha descrito que la emisión de diferentes monoterpenos y sesquiterpenos podría estar asociada a la tolerancia a *huanglongbing* (enverdecimiento) en cítricos (Hijaz, F., Nehela, Y. y Killiny, N. (2016). Possible role of plant volatiles in tolerance against huanglongbing in citrus.  
20 *Plant Signaling & Behavior*, 11(3), p.e1138193).

En función de su origen biosintético, los COV se dividen en varias clases, en concreto los terpenoides, los fenilpropanoides/bencenoides y los compuestos volátiles de hoja verde (GLV), estos últimos derivados de la ruta de las  
25 lipoxigenasas (LOX). Los GLV han sido asociados con la inducción de resistencia en diversas especies vegetales (véase, por ejemplo, Arimura, G., Tashiro, K., Kuhara, S., Nishioka, T., Ozawa, R. y Takabayashi, J. (2000). Gene Responses in Bean Leaves Induced by Herbivory and by  
30 Herbivore-Induced Volatiles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(2), págs. 305-310; Engelberth, J., Alborn, H., Schmelz, E. y Tumlinson, J. (2004). Airborne signals prime plants against insect herbivore attack.

*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(6), págs. 1781-1785; Heil, M. y Ton, J. (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science*, 13(6), págs. 264-272). La inducción de los GLV durante una infección bacteriana se descubrió por primera vez en la judía (Croft, K., Juttner, F. y Slusarenko, A. (1993). Volatile Products of the Lipoxygenase Pathway Evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) Leaves Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiology*, 101(1), págs. 13-24).

10 Todos estos resultados parecen indicar que los GLV podría jugar un papel en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos.

Por otro lado, en la interacción planta-patógeno, los estomas desempeñan un papel particularmente importante puesto que son el lugar de entrada de muchos patógenos foliares. Se trata de pequeños poros en la epidermis de las hojas, formados por un par de células guarda que han desarrollado mecanismos para detectar y responder a estímulos endógenos y ambientales. Al cambiar el tamaño de poro, los estomas pueden regular el intercambio de gases entre la planta y el medio ambiente, así como controlar la pérdida de agua. Hace varios años un estudio proporcionó evidencias del papel activo de los estomas en la limitación de la infección bacteriana. En particular, se encontró que los estomas se cerraban una hora después de exponer a la planta a una suspensión bacteriana, pudiendo activarse dicho cierre también por efectores proteicos bacterianos (Melotto, M., Underwood, W. y He, S. (2008). Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), págs. 101-122; Xin, X. y He, S. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), págs. 473-498).

Se ha descrito que el tratamiento de plantas *Arabidopsis* con (E)-2-hexenal produce el efecto de aumentar la susceptibilidad a la bacteria *Pst* (Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M. and Schuurink, R. (2013). Green Leaf Volatiles: A Plant's Multifunctional Weapon against Herbivores and Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), págs. 17781-17811), por lo que no se espera que este tipo de GLV ni derivados del mismo sean útiles en la protección de plantas frente a infecciones.

10 A partir del documento KR20110030796 A se conoce un método para inducir resistencia a enfermedades de plantas que consiste en tratar la planta con BTH (benzotiadiazol) o bacterias no patógenas, produciendo de ese modo la emisión de nonanal por parte de la planta el cual provoca el aumento de  
15 la respuesta inmunitaria de las plantas.

También se conoce el documento ES2277703 B1, que da a conocer la inhibición de la expresión del gen *Ep5C*, que codifica una peroxidasa catiónica extracelular, lo cual es suficiente para conferir una marcada resistencia al patógeno  
20 *Pseudomonas syringae pv. tomato (P.s. tomato)* que causa la mancha bacteriana, una enfermedad devastadora de las plantas del tomate.

Sin embargo, los métodos de conferir resistencia a enfermedades en plantas conocidos hasta ahora presentan  
25 ciertos inconvenientes, en concreto debido a que su eficacia resulta inferior a la deseable y/o a que resultan complejos, y por tanto costosos, de implementar.

Por tanto, sigue existiendo en la técnica la necesidad de un compuesto, una composición y un uso alternativos para  
30 conferir a las plantas protección frente a enfermedades provocadas por infecciones por diversas clases de patógenos.



a las siguientes figuras:

La figura 1 muestra los resultados de razón de apertura de estomas en un estudio realizado con plantas de tomate tras tratamientos con butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) durante 24 horas, en comparación con plantas de tomate sin tratar (control).

La figura 2 muestra la razón de apertura de estomas en plantas de tomate Flora Dade tratadas con diversos ésteres de (Z)-3-hexenol así como en plantas sin tratamiento.

La figura 3 muestra el crecimiento bacteriano en plantas de tomate infectadas con *Pseudomonas syringae* pv DC3000 pv. *tomato* tras un tratamiento previo con butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) durante 24 horas, así como sin tratamiento previo (control).

La figura 4 muestra los resultados de razón de apertura de estomas en un estudio realizado con otras especies.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los presentes inventores llevaron a cabo extensos estudios para determinar los efectos de diversos GLV, en concreto diversos ésteres de (Z)-3-hexenol, sobre el cierre estomático en plantas así como la relación entre dicho cierre estomático y la resistencia frente a infecciones. A continuación se describirán de manera detallada los experimentos llevados a cabo.

De manera resumida, en primer lugar se realizó el tratamiento con el/los compuesto(s) volátil(es) de estudio tal como se describirá a continuación. A las 24 h se infectaron las plantas con los inóculos bacterianos previamente preparados tal como se describirá a continuación. A 1 dpi (día post-infección) se tomaron muestras tal y como se indicará a continuación para realizar el estudio de la infección bacteriana: conteo bacteriano y medida de apertura



estomática.

### Materiales y métodos

#### Material vegetal

5 En los siguientes ejemplos se emplearon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad Flora-Dade (FD).

Se realizó la germinación de las semillas mediante cultivo *in vitro* en condiciones estériles. Las semillas quedaron envueltas en una malla cerrada con un hilo.

10 Posteriormente, se introdujeron las bolsitas de cada tipo de semilla durante 30 minutos en un bote con: 75 ml de agua destilada, 75 ml de lejía y 5-6 gotas de Tween 20. Las semillas permanecieron en agitación en la lejía con el fin de debilitar la testa y facilitar la germinación. A continuación  
15 se realizó una serie de agua, que consistía en hacer pasar las bolsitas de semillas por 3 botes de agua destilada durante 5 min, 10 min y 15 min con el fin de ir progresivamente eliminando el exceso de lejía. Se sembraron las semillas en una cabina de flujo laminar con material  
20 estéril sobre placas Petri grandes con papel de filtro y 14 ml de agua destilada. Las placas permanecieron durante dos días a 24°C en la oscuridad.

Cuando se produjo la germinación de las semillas, se procedió a cultivarlas en el invernadero, a una temperatura  
25 que oscilaba entre 18-26°C, con una humedad relativa del 50-70% y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Para dichos cultivos, se sembró cada semilla en macetas individuales (12 cm de profundidad x 13 cm de diámetro) de turba y perlita. Se sometieron las macetas a  
30 riego manual con solución de Hoagland.

#### Tratamiento con compuestos volátiles

Se colocaron las plantas de estudio en cámaras de

metacrilato distribuyéndolas en función de la capacidad volumétrica de cada una. Dicha capacidad era de dos, tres y cinco plantas para las cámaras pequeña (45 l), mediana (70 l) y grande (110 l), respectivamente. Conociendo la densidad y la masa molecular de cada compuesto, se calculó el volumen que habría que colocar en pequeños algodoncillos hidrófilos para obtener una concentración final de cada compuesto de 5  $\mu\text{M}$  en cada cámara. Una vez añadido el volumen de cada compuesto a su cámara correspondiente, se sellaron las cajas con vaselina y se precintaron las tapas con película transparente y cinta adhesiva para garantizar una atmósfera cerrada y uniforme de los compuestos volátiles.

El tratamiento con cada compuesto se realizó de manera individual, es decir, cada caja contenía un único compuesto. Las cajas permanecieron cerradas durante 24 h, y no se abrieron hasta el momento de la toma de muestras.

#### Material microbiológico

Las bacterias empleadas en el presente trabajo pertenecen a la especie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, en concreto la cepa *Pst*  $\Delta\text{AvrPto}$ , la cual tiene delecionado el gen de avirulencia *AvrPto* y, por lo tanto, no puede ser reconocida por el gen de resistencia *Pto* de la variedad de tomate, generando de esta forma una interacción compatible y produciéndose la enfermedad.

Se almacenó la cepa bacteriana a  $-80^{\circ}\text{C}$  en glicerol, un crioprotector iónico que reduce la cantidad de hielo, preservando así las células en el proceso de congelación.

#### 30 Infecciones

Se inocularon las plantas de tomate con la cepa bacteriana *Pst*  $\Delta\text{AvrPto}$  cuando éstas presentaban la tercera y cuarta hoja verdadera lo suficientemente desarrolladas, es

decir, a los 25-30 días.

Los medios de cultivo empleados para llevar a cabo las infecciones y el conteo bacteriano fueron los siguientes:

5           Tabla 1: Composición y preparación de 1 l de medio de cultivo bacteriano LB agar

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
LB agar (Pronadisa)	35 g
H <sub>2</sub> O destilada	Hasta 1 l
Someter a autoclave (121°C, 15 min)	
Kanamicina (100 mg/ml)	0,25 ml
Rifampicina (10 mg/ml)	10 ml
Espectinomicina (10 mg/ml)	2,5 ml

Tabla 2. Composición y preparación de 1 l de medio de cultivo bacteriano King B líquido.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Proteosa peptona	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
Glicerol	15 g
H <sub>2</sub> O destilada / Ajustar a pH 7	Hasta 1 l
Someter a autoclave (121°C, 15 min)	
MgSO <sub>4</sub> 1 M estéril	5 ml
Rifampicina (10 mg/ml)	5 ml

10

Tabla 3. Composición y preparación de 1 l de medio de cultivo bacteriano King B agar.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
King B agar (King B Medium Pseudomonas F Agar, USP) (Pronadisa)	37 g
H <sub>2</sub> O destilada	Hasta 1 l
Glicerol	10 g

## ES 2 623 386 B2

Someter a autoclave (121°C, 15 min)	
Rifampicina (10 mg/ml)	5 ml

Se cultivó la bacteria, previamente almacenada en glicerol a -80°C, en estrías en placas Petri pequeñas (90 mm de diámetro) y se hicieron crecer en la oscuridad durante 48 horas a 28°C, conteniendo cada placa 25 ml de medio LB agar (Pronadisa) con los antibióticos indicados anteriormente (tabla 1). Tras observarse el crecimiento de colonias, éstas se recogieron con puntas de pipeta y se sembraron en 3 ml de medio King B líquido en tubos Falcon de 50 ml (tabla 2). Las bacterias crecieron en agitación a 200-220 rpm y 28°C durante 24 h. Posteriormente, se pasó 1 ml del cultivo bacteriano resultante a un tubo Falcon nuevo con 15 ml del mismo medio para refrescar la bacteria y promover el crecimiento. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas que en la etapa anterior. Finalmente, el cultivo bacteriano repartido en todos los tubos se juntó en 4 tubos Falcon. Se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 rpm y se resuspendió el sedimento de cada tubo en 20 ml de MgCl<sub>2</sub> 10 mM estéril.

Se midió la absorbancia a 600 nm de una dilución 1:10 del cultivo bacteriano en un espectrofotómetro, en base a la cual se calcularon los volúmenes de cultivo bacteriano y de MgCl<sub>2</sub> 10 mM necesarios para obtener un inóculo final con una densidad óptica de 0,1 a 600 nm (D.O.). Dicha densidad óptica corresponde aproximadamente a  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por mililitro (u.f.c./ml).

Se llevó a cabo la infección por inmersión, sumergiendo las plantas hasta la base del tallo en una solución de MgCl<sub>2</sub> 10 mM con cultivo bacteriano durante 30 segundos. Se sumergieron de igual modo las plantas de control en una solución estéril de MgCl<sub>2</sub> 10 mM sin inóculo bacteriano.

Toma de muestras

En el caso de los experimentos de conteo, así como para la medición de la razón de estomas, la muestra se recogió en fresco de la planta y se procedió a continuar cada  
5 experimento independientemente.

Crecimiento bacteriano

Esta técnica consiste en realizar un recuento de las unidades formadoras de colonias (u.f.c.) presentes en el  
10 material vegetal infectado.

Se tomaron 3 discos de 1 cm<sup>2</sup> de cada planta con la ayuda de un sacabocados y se sumergieron en tubos Eppendorf con 300 µl de MgCl<sub>2</sub> 10 mM, de forma que cada tubo correspondía a una planta. Con el uso de perlas de vidrio en el interior de los  
15 tubos y utilizando el homogeneizador *TissueLyser II* (Qiagen), se machacaron los discos, y se añadieron otros 700 µl de MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Se agitó con vórtex hasta su completa homogeneización, tras lo cual se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta 10<sup>-7</sup>. Se vertió medio King B agar  
20 (Pronadisa) en placas Petri de 90 mm de diámetro, tal y como se indica en la tabla 3. Una vez solidificado, se sembraron 100 µl de las últimas cuatro diluciones seriadas (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup>) en las placas y se extendieron con la ayuda de pequeñas esferas de vidrio. Tras la incubación de las placas  
25 a 28°C durante 48 h, se realizó el recuento de las colonias aisladas formadas, en aquellas diluciones en las que el recuento era posible, con la ayuda de un contador de colonias (Selecta).

30 Mediciones de la apertura estomática

Para medir la razón de los estomas de las plantas se realizaron fotografías del molde de los mismos. Se obtuvieron

dichos moldes del envés de los foliolos, empleando pegamento líquido universal Imedio. Formando una fina capa de pegamento y dejándolo secar pudo obtenerse un molde del envés que se despegó cuidadosamente con ayuda de unas pinzas. Con el  
 5 objetivo de conseguir visualizar los estomas en el microscopio óptico, se montaron secciones planas de los moldes en varios portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos y se hidrataron con ayuda de una pipeta Pasteur y agua destilada.

10 Mediante la técnica microscópica de campo claro es posible visualizar en el microscopio muestras incoloras sin necesidad de teñirlas previamente. De esta forma, se realizaron 5 fotografías de cada muestra en las que los estomas eran perfectamente visibles. Posteriormente, mediante  
 15 el uso del programa de análisis de imagen Image J, se midió el ancho y alto de 50 estomas por planta de 3 plantas por condición, para calcular la razón media de los mismos en cada muestra.

## 20 Resultados

En la figura 1 se representan gráficamente los resultados de razón de apertura de estomas obtenidos en los experimentos anteriormente detallados para plantas que no se sometieron a ningún tratamiento previo (control) así como  
 25 para plantas sometidas a un tratamiento previo durante 24 horas con butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB). La razón de apertura de estomas se define como la razón entre el radio menor y el radio mayor del estoma (véase la parte superior izquierda de la figura). Tal como puede apreciarse en la  
 30 figura 1, la razón de apertura de estomas en las plantas sometidas a tratamiento previo con HB es sustancialmente menor que la razón de apertura de estomas en las plantas de control. Los asteriscos (\*\*\*) indican que existe

significación estadística con un valor de  $p < 0,001$  con respecto a las plantas de control. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Las razones representadas en la figura 1 corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de las tres repeticiones de un experimento representativo.

En la figura 2 es un gráfico similar al de la figura 1 que muestra los resultados de razón de apertura de estomas obtenidos con plantas sin tratamiento previo como control (T0), así como con plantas sometidas a tratamiento previo durante 24 horas con acetato de (Z)-3-hexenilo (HA), butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) y propionato de (Z)-3-hexenilo (HP). Tal como puede apreciarse, a pesar de la similitud estructural entre los tres compuestos empleados en el estudio, el butanoato de (Z)-3-hexenilo produjo resultados sustancial y sorprendentemente mejores que los otros dos compuestos empleados. En concreto, el acetato de (Z)-3-hexenilo no produjo sustancialmente ninguna reducción en la razón de apertura de estomas con respecto a las plantas de control (T0). El propionato de (Z)-3-hexenilo sí produjo una reducción significativa con respecto a las plantas de control (de nuevo los asteriscos indican un valor de  $p < 0,01$ ), pero aún así no pudo compararse con los resultados sustancialmente mejores obtenidos con el butanoato de (Z)-3-hexenilo.

En la figura 3 se muestran los resultados de crecimiento bacteriano obtenidos con los experimentos anteriores. Más específicamente, se representa el crecimiento bacteriano en  $\log(\text{u.f.c./cm}^2)$  a las 24 horas tras la infección para plantas sin tratamiento previo (control) así como para plantas sometidas a un tratamiento previo durante 24 horas con butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB). Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los resultados mostrados en la gráfica de la figura 3 corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar de cinco plantas independientes de un experimento

representativo. Los asteriscos (\*\*\*) indican que existe significación estadística con un valor  $p < 0,001$  con respecto a las plantas de control.

5 Tal como puede apreciarse en la figura 3, el tratamiento con HB, a la concentración indicada y en las condiciones de ensayo, da lugar a un número significativamente más reducido de u.f.c. en los tejidos infectados y, por lo tanto, incrementa de manera significativa la resistencia de las plantas de tomate Flora-Dade a la bacteria *Pst*.

10 Por tanto, se demostró que el tratamiento de plantas de tomate con butanoato de (Z)-3-hexenilo produjo el cierre estomático (figuras 1 y 2) lo que a su vez dio como resultado la protección de las plantas de tomate Flora-Dade frente a la infección por bacteria *Pseudomonas syringae* aumentando su  
15 resistencia a la misma (figura 3), y que dicha protección era significativamente superior a la que podía obtenerse mediante otros ésteres de (Z)-3-hexenol estructuralmente relacionados tales como acetato de (Z)-3-hexenilo y propionato de (Z)-3-hexenilo. Además, los resultados obtenidos son  
20 particularmente sorprendentes a la vista de la técnica anterior, en concreto el artículo de Scala, A. et al., 2013, citado anteriormente, en el que se menciona que el (E)-2-hexenal produce el efecto contrario al aumentar la susceptibilidad de plantas *Arabidopsis* a la bacteria *Pst*.

25 En la figura 4 se representan gráficamente los resultados de razón de apertura de estomas obtenidos para plantas que no se sometieron a ningún tratamiento previo (control) así como para plantas de otras especies, tales como nicotiana, cítrico y alfalfa, sometidas a un tratamiento  
30 previo durante 24 horas y durante 48 horas con butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB). Tal como puede apreciarse en la figura 4, la razón de apertura de estomas en las plantas sometidas a tratamiento previo con HB es sustancialmente menor que la



razón de apertura de estomas en las plantas de control.

El butanoato de (Z)-3-hexenilo no sólo es el primer compuesto volátil descrito que puede inducir de manera significativa el cierre estomático, y por tanto protección  
5 frente a infecciones, sino que su uso presenta una serie de ventajas, entre las que cabe destacar las siguientes:

- Es un compuesto muy eficaz.
- Su origen es natural y las dosis utilizadas están en el orden de magnitud de las emitidas por las plantas,  
10 por lo que no resulta tóxico.
- Se trata de un producto comercial barato y de fácil síntesis química (reacción de condensación de ácido butanoico con Z-3-hexenol en medio ácido).
- Es un compuesto estable.
- 15 • Dada su naturaleza volátil, su modo de aplicación puede resultar una ventaja, ya que puede aplicarse tanto por pulverización como asociado a dispositivos difusores.
- Los tratamientos con el compuesto no dejarán residuos  
20 en el cultivo.

Aunque se han descrito experimentos específicos llevados a cabo con plantas de tomate de la variedad Flora-Dade, el experto en la técnica entenderá que el compuesto descrito en la presente invención (butanoato de (Z)-3-hexenilo) será  
25 igualmente útil para su uso en la protección de otro tipo de plantas mediante cierre estomático.

Asimismo, aunque se han descrito experimentos en los que se han sometido plantas de tomate a infección por bacterias *Pseudomonas syringae*, el experto en la técnica entenderá que  
30 el compuesto descrito en la presente invención (butanoato de (Z)-3-hexenilo) será igualmente útil para su uso en la protección de plantas frente a infecciones por otro tipo de

bacterias, así como a infecciones por otro tipo de patógenos (por ejemplo, hongos y virus).

Por tanto, tal como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere al compuesto butanoato de (Z)-  
5 3-hexenilo para su uso en la protección de plantas mediante cierre estomático.

Además, la invención también se refiere a composiciones de protección de plantas (fitosanitarias) que comprenden butanoato de (Z)-3-hexenilo así como un portador adecuado  
10 desde el punto de vista fitosanitario, tal como por ejemplo agua, y opcionalmente un agente tensioactivo, tal como por ejemplo Tween al 0,05%. Estas composiciones pueden administrarse a las plantas que se desea proteger mediante cualquier medio adecuado, tal como pulverización,  
15 dispositivos difusores, etc.

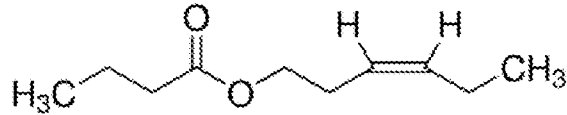
La invención también se refiere a un método de protección de plantas mediante cierre estomático que comprende aplicar butanoato de (Z)-3-hexenilo a las plantas que se desea proteger mediante cualquier medio adecuado  
20 (pulverización, dispositivos difusores, etc.).

Por último, aunque se ha descrito y demostrado la relación entre el cierre estomático en las plantas y su protección frente a estreses bióticos tales como infecciones, es concebible que el cierre estomático también protegerá a  
25 las plantas frente estreses de tipo abiótico, tales como sequía. En efecto, mediante el cierre de los estomas se reducirá la cantidad de agua que pierden las plantas por los mismos y de ese modo se aumentará su resistencia a periodos de sequía.

30

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un compuesto de fórmula I



Fórmula I

5 para la protección de plantas mediante cierre estomático.

2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que protege las plantas frente a infección.

3. Uso según la reivindicación 2, caracterizado por que  
10 protege las plantas frente a infección bacteriana.

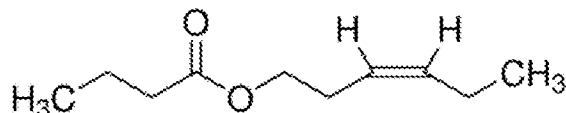
4. Uso según la reivindicación 3, caracterizado por que protege las plantas frente a infección por bacterias *Pseudomonas syringae*.

5. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que  
15 protege las plantas frente a sequía.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que las plantas protegidas son plantas de tomate.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,  
20 caracterizado por que las plantas protegidas son plantas de nicotiana, cítrico o alfalfa.

8. Método de protección de plantas mediante cierre estomático que comprende aplicar a las plantas un compuesto de fórmula I



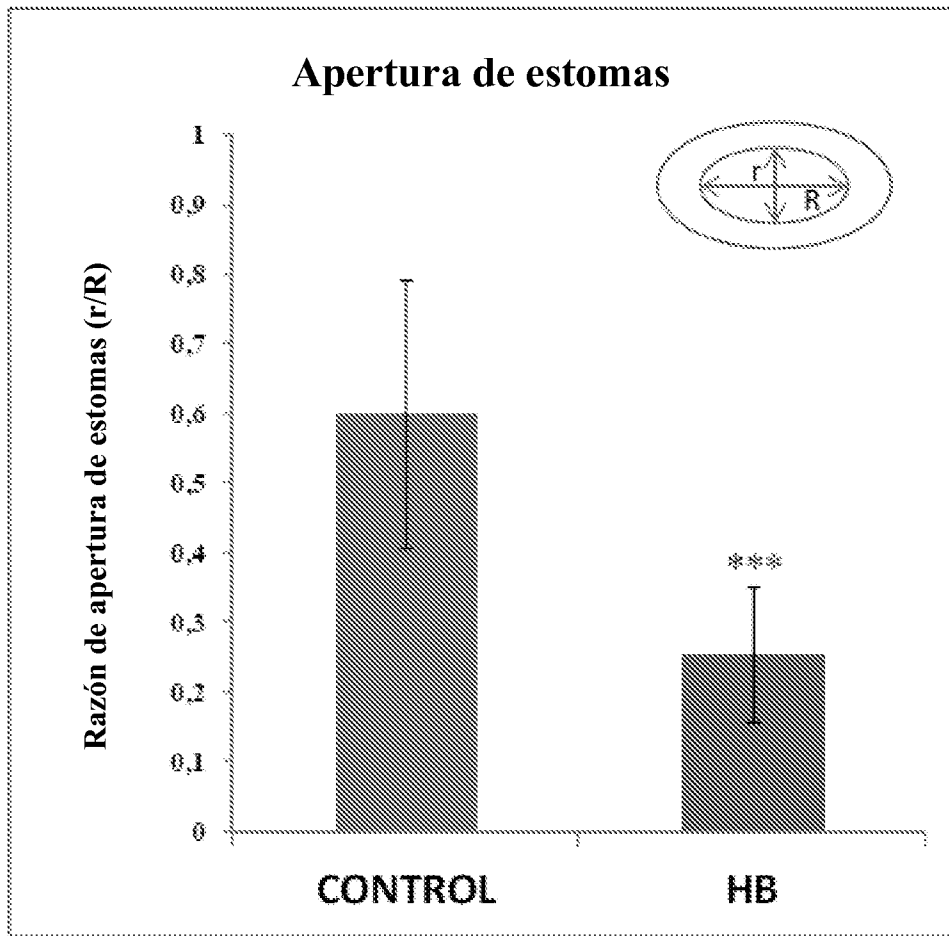
Fórmula I.

25 9. Método según la reivindicación 8, caracterizado por que las plantas se protegen frente a infección.

10. Método según la reivindicación 9, caracterizado por que

las plantas se protegen frente a infección bacteriana.

11. Método según la reivindicación 10, caracterizado por que las plantas se protegen frente a infección por bacterias *Pseudomonas syringae*.
- 5 12. Método según la reivindicación 8, caracterizado por que las plantas se protegen frente a sequía.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, caracterizado por que las plantas protegidas mediante dicho método son plantas de tomate.
- 10 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, caracterizado por que las plantas protegidas mediante dicho método son plantas de nicotiana, cítrico o alfalfa.



**FIG. 1**

### Apertura de estomas

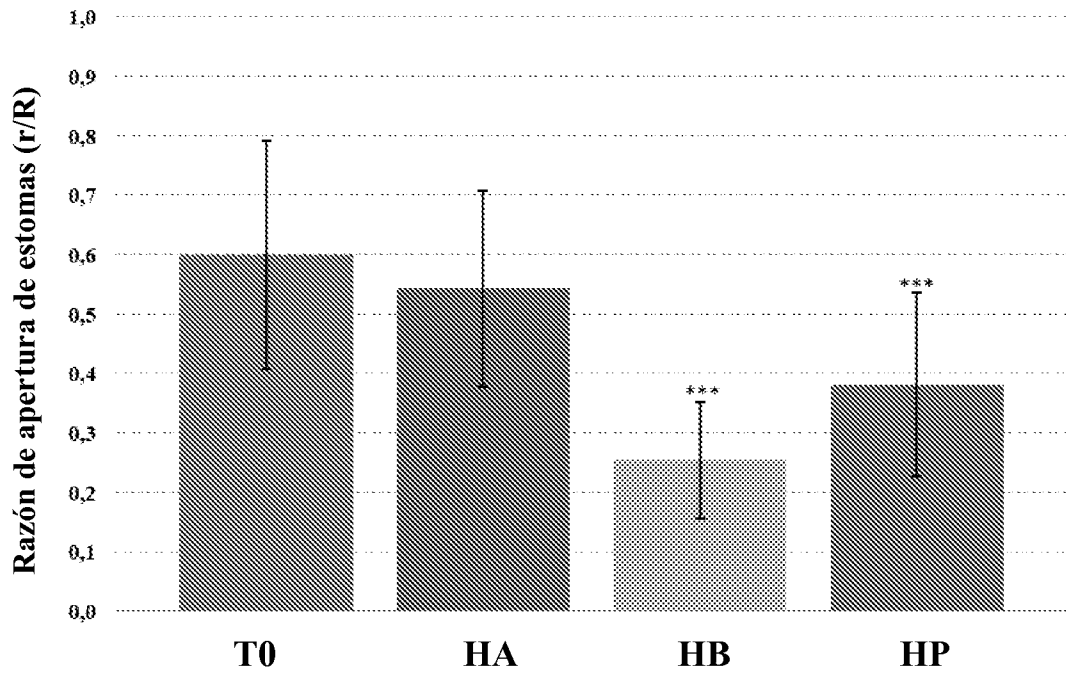
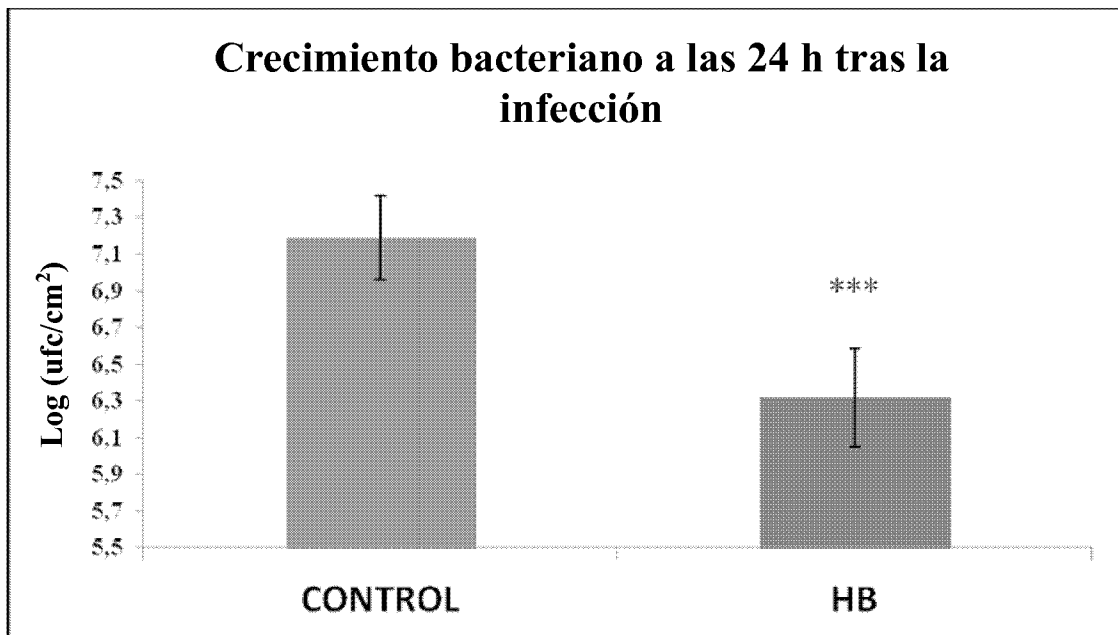
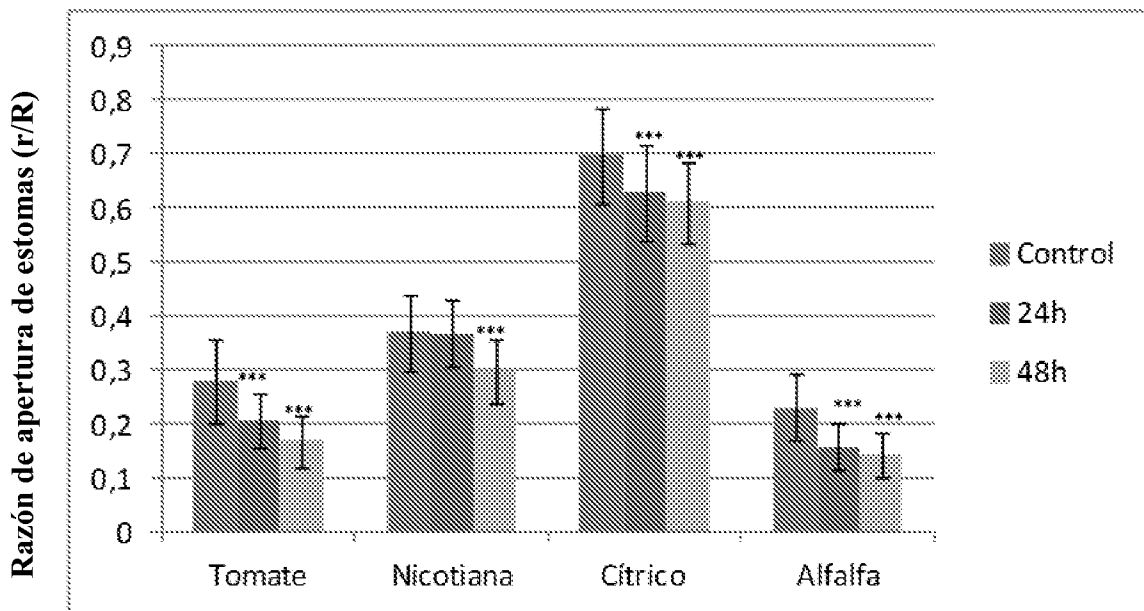


FIG. 2



**FIG. 3**



**FIG. 4**