

**PROCEDIMIENTO PARA LA PROFILAXIS DE INFECCIONES EN PLANTAS
ÚTILES Y ORNAMENTALES, PREFERENTEMENTE EN LA VITICULTURA,
ASÍ COMO EN PLANTAS LEÑOSAS**

5 Solicitante: Biopract GmbH, 12489 Berlín, DE

Inventores: Dr. Ing. Matthias Gerhardt, Dr. agr. Joachim Pheiffer, Prof.
Hanns-Heinz Kassemeyer, Dr. Rene Fuchs, Dr. Sophie Jacobs,

Descripción

10 La invención se refiere a un procedimiento para la profilaxis de
infecciones por hongos, en particular por oomicetos, así como de infecciones
bacterianas en plantas útiles y ornamentales. Los campos de aplicación son la
horticultura, la fruticultura, la viticultura y el cultivo de plantas ornamentales,
preferentemente la viticultura y la horticultura.

Importancia, desarrollo y control de infecciones por oomicetos

15 Las enfermedades de plantas conducen en plantas útiles y ornamentales
así como en plantas leñosas anualmente a altas pérdidas económicas.
También en el cultivo hidropónico de hortalizas y plantas ornamentales en
cultivos bajo cristal desempeñan los hongos y oomicetos, tales como
Phytophthora, *Pythium* y *Peronospora*, como origen de enfermedades de
20 plantas un especial papel (Malathrakakis & Goumas, 1999; Paulitz & Berlangier,
2001). Tienen especial importancia económica en horticultura (en particular
patata y tomate), en fruticultura, en el cultivo de plantas ornamentales y en
viticultura así como en la silvicultura. La patata se cultivó en 2013
mundialmente en una superficie de uso agrícola de 19,3 millones de hectáreas
25 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division). El

patógeno más importante en el cultivo de patatas, cuya importancia ha aumentado más debido a la ampliación del cultivo en climas más cálidos, es el oomiceto *Phytophthora infestans*, el agente patógeno del tizón tardío y la podredumbre de los tubérculos (Oerke y Steiner, 1996). Su propagación puede controlarse solo mediante uso continuo de fungicidas (más de 235 millones de US\$ anualmente solo para el cultivo de patatas). El mercado total únicamente para fungicidas comprende 5,5 mil millones de US\$ por año (Powell & Jutsum, 1993).

Solo para la protección de plantas en la viticultura se gastan en Alemania anualmente de manera aproximada 100 millones de euros (Ochßner, 2009). En la viticultura ecológica se usan exclusivamente productos fitosanitarios que contienen cobre, que sin embargo son peligrosos para el medioambiente y probablemente tóxicos. Por este motivo es de gran interés establecer agentes protectores alternativos, mejorados que sean eficaces contra los agentes patógenos y al mismo tiempo sean compatibles con el medioambiente.

El ciclo de los oomicetos se representa en este caso en el ejemplo de *Plasmopara viticola*, el falso mildiú de la vid. Éste se subdivide en dos fases de distinta importancia epidemiológica. En la fase sexual se forma la oospora, que sirve para la hibernación del agente patógeno. En el ciclo de verano asexual se liberan en gran cantidad esporangios. *Plasmopara viticola* sobrevive al invierno como oosporas en el suelo en restos de hojas fuertemente infestadas. Las oosporas se vuelven listas para germinar en el transcurso del invierno tardío y obtienen su capacidad de germinar hasta bien entrado el verano temprano. Tan pronto como se caliente el suelo y hayan caído precipitaciones de manera suficiente, éstas germinan y forman los esporangios primarios. Hasta la mitad

de junio pueden germinar una y otra vez oosporas con lluvia intensa. Una parte de las oosporas puede reposar también durante un año y llegar a germinar solo en el año siguiente. Por regla general tiene lugar la germinación y la liberación de las zoosporas del esporangio primario, cuando las temperaturas aumentan por encima de 10 °C y hayan caído más de 8 mm de precipitaciones. En estas condiciones previas se despliegan en la mayoría de los casos las primeras hojas de la vid, de modo que puede tener lugar la infección primaria. Para la infección primaria por las zoosporas germinadas deben estar las hojas suficientemente humectadas con agua. Exclusivamente en esta fase puede impedirse o reducirse la infección, cuando se logra dañar o inhibir las zoosporas.

La infección primaria es el punto de partida del ciclo de verano de *Plasmopara viticola*, en el que se reproduce el agente patógeno con esporangios asexualmente y en condiciones favorables para la reproducción pueden originarse epidemias. A la infección primaria le sigue el tiempo de incubación, durante el cual se desarrolla el agente patógeno en el interior de la hoja, sin que puedan distinguirse síntomas visibles. Un tratamiento de la infección ya no es posible en este momento. El crecimiento y el desarrollo del agente patógeno dependen mucho de la temperatura, de modo que a temperaturas más altas el micelio atraviesa más rápidamente el tejido y las manchas de aceite aparecen antes que a temperaturas más bajas. Al final del tiempo de incubación aparecen las denominadas manchas de aceite como signos visibles de la infección por hongos. Tan pronto como aumenta por la noche la humedad relativa del aire por encima del 95 % y las temperaturas predominan superiores a 12 °C, salen los esporangióforos de los estomas de la

superficie de la hoja infectada. La propagación de los esporangios se realiza mediante el movimiento del aire o gotas de agua. Si llegan en una gota de agua a un órgano verde de su planta huésped, entonces eclosionan las zoosporas. La eclosión de las zoosporas y la infección siguiente se realizan en condiciones

5 óptimas a 24 °C en el intervalo de cuatro horas. Si imperan temperaturas más bajas o más altas, eclosionan las zoosporas de manera retardada y se prolonga el proceso de infección. *Plasmopara viticola* puede infectar hojas, inflorescencias junto con estructura de tallo, bayas y puntas de rebrotes, cuando éstas presentan estomas y están húmedas. Ya son suficientes para la

10 infección pequeñas gotas de agua, sin embargo las condiciones de infección son más favorables cuando la humectación con agua es amplia y dura mucho tiempo. Tras cada infección sigue a su vez un tiempo de incubación y a continuación de esto la erupción de los esporangios, tan pronto como impera por la noche humedad de manera suficiente. *Plasmopara viticola* pertenece a

15 los agentes patógenos policíclicos y puede realizar durante un periodo vegetativo una serie de ciclos de desarrollo. Cuando imperan durante un tiempo más largo las condiciones óptimas para la erupción de los esporangios y para infecciones y los tiempos de incubación son cortos debido a las proporciones de temperatura, puede desarrollarse muy rápidamente una

20 epidemia. La sequedad retrasa la propagación de *Plasmopara viticola* e inhibe el desarrollo de epidemias. Es posible prever localmente fases de alto riesgo de infección y con ello acometer de manera dirigida medidas de protección profilácticas.

Bajo las condiciones climáticas que imperan en el centro de Europa

25 puede contarse en cualquier año con infecciones por agentes patógenos de

este tipo. En qué medida estas infecciones conducen a epidemias, depende mucho del transcurso de las condiciones meteorológicas anuales y no puede predecirse todavía al inicio del periodo vegetativo. Las epidemias de, por ejemplo, la peronospora de la vid (*Plasmopara viticola*) pueden transcurrir de manera muy impetuosa en las especies de uva clásicas altamente susceptibles en el intervalo de pocos días de lluvia. Por tanto debe detectarse esta infección en un estadio temprano y debe controlarse. Ya no es posible una regulación posterior cuando la infestación ya está avanzada. Por este motivo es posible un cultivo de plantas rentable solo con medias preventivas contra infecciones de este tipo. Un procedimiento de pronóstico, con el que puede realizarse de manera dirigida este control preventivo, se desarrolló para *Plasmopara viticola* ya en el Instituto Estatal de Viticultura y se introdujo en la práctica.

Para el cultivo de plantas convencional se ofrecen actualmente numerosos fungicidas. Solo en la viticultura están autorizados actualmente 29 fungicidas para el campo de aplicación de peronospora de la vid.

Para la viticultura ecológica significa la peronospora de la vid un reto, dado que ésta debe tratarse en este caso forzosamente de manera preventiva y actualmente tienen una autorización solo preparados que contienen cobre (por ejemplo Cuprozin). Debido a las dudas ecotoxicológicas conocidas con respecto al cobre es urgentemente necesario que se encuentren alternativas a este principio activo. Sin embargo deben presentar estas alternativas suficiente actividad también bajo alta presión de infestación. Desde hace años, los ensayos han mostrado que la gran mayoría de los preparados citados como agentes de fortalecimiento de plantas no tienen ninguna acción satisfactoria contra la peronospora de la vid. Algunos agentes de fortalecimiento de plantas

muestran, con una presión de infestación baja, una acción contra la peronospora de la vid, sin embargo en este caso no sería necesaria una medida de lucha. En caso de una presión de infestación más alta, que justifica una lucha también por consideraciones económicas, era insignificante la acción de los preparados sometidos a prueba. En estos ensayos ha de distinguirse que en el cultivo de plantas ecológico actualmente no es practicable ninguna lucha biológica contra la peronospora de la vid. Justamente en la viticultura ecológica con la posibilidad limitada de detener una epidemia, son necesarios urgentemente conceptos eficaces y aptos para la práctica para el control biológico de epidemias.

Importancia, desarrollo y control de infecciones bacterianas

Aunque el número de bacterias fitopatógenas es más bajo que el número de agentes patógenos similares a hongos, son muy altos los daños de plantas útiles provocados por enfermedades bacterianas. Las bacterias del género *Xanthomonas* originan mundialmente enfermedades en todos los grupos principales de plantas superiores, que van acompañadas de lesiones cloróticas y necróticas, marchitamiento y podredumbres. Un ejemplo con alta importancia económica es la podredumbre negra de especies de col, provocada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, que conduce en caso de infestación de plantas de arroz a la enfermedad de hoja blanca que representa una de las enfermedades del arroz más graves, y como resultado posterior conduce a grandes problemas económicos y sociales. Igualmente ha de mencionarse en este caso el patovar *X. axonopodis* pv. *citri*, el agente patógeno del cáncer de los cítricos, y *X. campestris* pv. *Vesicatoria*, el agente patógeno de la enfermedad de manchas bacteriana en pimiento y

tomate, que es de importancia económica sobre todo en regiones con clima caliente-húmedo.

Además ha de nombrarse en este caso el fuego bacteriano, provocado por el agente patógeno de informe obligatorio *Erwinia amylovora*, cuyas plantas
5 huéspedes son las rosáceas, tal como manzana, pera y membrillo. *E. amylovora* conduce al marchitamiento de las hojas y flores de plantas infestadas, que se decoloran entonces de marrón o negro. Además ha de nombrarse la especie bacteriana *Pseudomonas syringae*, el desencadenante de distintas enfermedades de plantas tales como cáncer, marchitamiento y
10 manchas de importantes plantas de cultivo tales como tomate, pimiento, soja. Esta especie generalizada es de gran importancia en muchos cultivos bajo cristal tales como tomates, pepino y calabacín.

La mayoría de los fitopatógenos bacterianos descritos pertenecen al grupo de las proteobacterias y son organismos Gram-negativos (por ejemplo
15 *Pseudomonas*, *Xanthomonas*). Sin embargo existen también agentes patógenos Gram-positivos relevantes, tales como por ejemplo *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, que es el agente patógeno del marchitamiento bacteriano del tomate. Este parásito de cuarentena tiene gran importancia en campos de cultivo de tomates más cálidos y más secos así
20 como en invernaderos.

Las bacterias fitopatógenas tienen diversas estrategias para sobrevivir en el medioambiente, por ejemplo en el suelo, en material vegetal como semillas o en insectos. Para su propagación desempeñan un papel importante insectos, otros animales y el ser humano. El agua, por ejemplo en forma de gotas de
25 lluvia, representa un vector de transporte importante con respecto a la

distribución sobre una planta. Si las bacterias se transfieren a una planta huésped, pueden introducirse en las plantas a través de aberturas naturales, tales como estomas o hidátodos, o mediante lesiones sobre la planta. Una alta densidad de bacterias, así como condiciones externas tales como lluvia, alta
5 humedad del aire o sitios dañados en las superficies de las plantas facilitan la infección de una planta. En el interior de las plantas pueden reproducirse bien las bacterias, que colonizan el apoplasto y dañan desde allí toda la planta. Alteran la fisiología y morfología de las plantas y son debido a ello el desencadenante de síntomas patológicos tales como sitios necróticos,
10 defoliación, formación de costra, marchitamiento o podredumbre (De la Fuente y Burdman, 2011).

Por tanto es forzosamente necesario proteger las plantas útiles frente a tales infecciones bacterianas y debido a ello garantizar su cosecha. En la lista actual de los productos fitosanitarios autorizados en Alemania con acción
15 antibacteriana están expuestos distintos compuestos químicos y compuestos de cobre. Los preparados que contienen cobre son los únicos agentes que deben usarse a su vez en la agricultura ecológica. Los tratamientos con preparados que contienen cobre para el control de bacteriosis tienen solo una acción parcial y chocan contra sus límites, tan pronto como la densidad del
20 inóculo de bacterias haya sobrepasado un cierto umbral. Debido a los efectos ecotoxicológicos conocidos de compuestos de cobre y otros productos agroquímicos existen dudas fundadas con respecto al uso de tales agentes fitosanitarios. Además esto permite incluso en Alemania en casos excepcionales usar productos fitosanitarios, para el control del fuego
25 bacteriano, que contienen antibióticos como estreptomicina. La estreptomicina

es en otros países un agente autorizado contra bacteriosis, sin embargo al mismo tiempo es sumamente dudoso el uso de antibióticos, dado que mediante el uso no dirigido de antibióticos puede temerse repercusiones indeseadas sobre el medioambiente así como pérdidas de acción al producirse resistencia de las bacterias. Por tanto es urgentemente necesario que se desarrollen alternativas mejoradas, altamente eficaces y económicamente relevantes a estos principios activos, que sean más compatibles para el ecosistema y los consumidores.

Desarrollo actual de las estrategias en la protección de plantas

1. A los productos fitosanitarios químicos se les exige continuamente requerimientos más altos en cuanto a la actividad, selectividad, especificidad, biodegradabilidad y acción sobre organismos no diana. Mientras tanto se encuentra una serie de productos fitosanitarios novedosos que corresponden a estos requerimientos. La aplicación de numerosos compuestos más antiguos, tales como hidrocarburos clorados (aldrina, DDT, DDD, dieldrina, Kelthan) está entretanto prohibida. Cada vez más se encuentran bajo crítica sin embargo también productos fitosanitarios químicos usados actualmente (por ejemplo orto-fenilfenol E 231 o tiabendazol E 233). Éstos muestran numerosos efectos secundarios nocivos, que hacen problemático su uso. A esto pertenecen además del daño de la planta de cultivo, modificaciones del sabor en el caso de frutas, acciones tóxicas sobre numerosos organismos beneficiosos, desarrollo de poblaciones resistentes de plagas, degradación incompleta mediante microorganismos y debido a esto una persistencia demasiado larga y enriquecimiento en el suelo así como finalmente el arrastre hacia el agua subterránea y el enriquecimiento en la cadena de alimentación del ser humano

y animal. (fuente: Umweltlexikon - www.umweltlexikon-online.de).

2. Cada vez más se establecen procedimientos de la protección de plantas biológica e integrada, tal como el uso de organismos útiles y feromonas contra insectos, el uso de antagonistas bacterianos y fúngicos existentes en el suelo así como el uso de extractos vegetales. A los géneros de organismos de acción antagonista más importantes pertenecen entre las bacterias *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* así como entre los hongos *Trichoderma*, *Coniothyrium* y *Verticillium*. Adquiere especial importancia en este contexto la bacteria *Bacillus subtilis*, que secreta como “rizobacteria que promueve el crecimiento de las plantas, *plant growth promoting rhizobacterium*” (PGPR) productos metabólicos de acción fitosanitaria y el género de hongos *Trichoderma*, cuyas cepas se usan como “agente de biocontrol, *biocontrol agent*” (Kücük, C. and M. Kivanc, 2002; DeMarco, J.L., *et al.*, 2003). Mientras que muchos agentes infecciosos animales pueden controlarse de manera suficiente mediante estos procedimientos biológicos, pueden combatirse solo con dificultad infecciones por oomicetos mediante estas medidas. En el sector agrario son de importancia destacada las siguientes enfermedades de plantas debido a su riesgo de infección y a las pérdidas que resultan de ello (tabla 1):

Tabla 1

	Grupo taxonómico	Enfermedad	Sector agrario	Ejemplos
Hongos	Ascomycota	Mildiú verdadero	Horticultura, cultivo de cereales, fruticultura,	<i>Erysiphe necator</i> (vid), <i>Blumeria graminis</i> (cereales)

			viticultura y cultivo de plantas ornamentales	
Ascomycota	Podredumbre del moho gris	Horticultura, fruticultura, viticultura y cultivo de plantas ornamentales	<i>Botrytis cinerea</i> (fresa, vid, etc.)	
Basidiomycota	Hongos de la roya	Horticultura, cereales, fruticultura y cultivo de plantas ornamentales	<i>Puccinia graminis</i> (cereales), <i>Phakospora pachyrhizi</i> (soja)	
Basidiomycota	Ustilaginales	Horticultura, cereales, fruticultura y cultivo de plantas ornamentales	<i>Ustilago maydis</i> (maíz), <i>Ustilago hordei</i> (cebada)	

Oomicetos	Oomycetes	Falso mildiú Podredumbre seca y tizón tardío	Horticultura, fruticultura, viticultura y cultivo de plantas ornamentales	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> (patata y tomate), <i>Plasmopara</i> <i>vitícola</i> (vid)
	Proteobacteria	Incendio bacteriano, marchitamiento, manchas entre otros.	Horticultura, cereales, fruticultura y cultivo de plantas ornamentales	<i>Erwinia</i> <i>amylovorans</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> , <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i>
Bacterias	Actinomycetes	Marchitamiento, entre otros.	Horticultura, cereales, fruticultura y cultivo de plantas ornamentales	<i>Clavibacter</i> <i>michiganensis</i>

Estado de la técnica

Se sabe que los preparados enzimáticos que escinden glicósidos del tipo de las hidrolasas de polisacáridos distintos de almidón muestran acciones en la

5 profilaxis y terapia de hongos fitopatógenos. Según esto puede partirse de un ataque directo de la enzima sobre estructuras de pared celular de los hongos, en particular de los oomicetos (documento DE 10 2205 048 520, Biopract

GmbH). Estas hidrolasas pueden dañar sin embargo también la pared celular de las plantas y por tanto son adecuadas solo de manera condicionada para la protección de las plantas.

El uso de enzimas del tipo de las hidrolasas de polisacáridos distintos de almidón para la profilaxis y la terapia de fitopatógenos fúngicos se soporta
5 mediante una serie de resultados también en otros campos. Por ejemplo existen experiencias en la lucha contra la micosis en peces basada en oomicetos con preparados enzimáticos complejos de *Trichoderma* spp. (documento WO 2004/002574 A1 Biopract GmbH).

10 La patente de Estados Unidos 6663860 (Tvedten, 16 de diciembre de 2003) describe proteasas como pesticida contra, entre otros, insectos, bacterias y hongos. Sin embargo no se prevé un uso para la profilaxis de la infestación por hongos en la viticultura.

Además se describe en diversas patentes la combinación de un pesticida
15 y una enzima o de una proteasa, partiendo la acción descrita en este caso más bien del pesticida y no de la enzima añadida sola (documentos WO 2013/096383 A2, CN 103461383 A, WO 1997/047202 A1 , WO 1990/003732 A1). Otras patentes describen la combinación de detergentes y enzimas (documento US 7393528 B2), de extractos de plantas y proteínas (documentos
20 WO 2001/030161 A1) así como de una sustancia de superficie activa y una enzima (documento EP 184288 A1). Tampoco de estas publicaciones resulta que la propia enzima es responsable de la acción pesticida.

Finalmente se ha descrito en el pasado enzimas o combinaciones enzimáticas que mostraban, entre otras cosas, acciones antifungicidas o
25 antibacterianas, como por ejemplo una proteasa de plantas (documento WO

1991/002459 A1), una proteasa de una lombriz (documento JP 2011177105A) o del sobrenadante de cultivo de una fermentación de *Bacillus* (documento JP 54073182 A).

5 Ninguna de las invenciones mencionadas anteriormente describe una solución comparablemente eficaz del problema que existe ahora como antes de la infestación de plantas de cultivo por oomicetos y bacterias. Las proteasas descritas en el presente documento representan con ello por primera vez una alternativa altamente eficaz y al mismo tiempo justificable desde el punto de vista ecológico a los productos fitosanitarios habituales.

10 **Objetivo de la invención**

La invención tiene el objetivo de desarrollar un agente altamente eficaz e inocuo para la propia planta así como para el ecosistema para el control de infecciones por hongos, en particular oomicetos, e infecciones bacterianas en plantas útiles y ornamentales. La invención se basa en el objetivo de
15 desarrollar un procedimiento para la profilaxis de infecciones de plantas útiles en la agricultura por agentes fitopatógenos. En particular debe conseguirse el objetivo para detectar de manera temprana e impedir epidemias tales como la peronospora de la vid en especies de vino. La facilitación de agentes adecuados se comprende igualmente por el objetivo de la invención.

20 Este objetivo se consigue mediante las medidas descritas en las reivindicaciones. El procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado por que se prepara un concentrado o una dilución lista para su uso, que contiene una proteasa sola o una combinación de proteasas y β -glucanasas y/o quitinasas. La parte esencial de la invención es la sorprendente
25 posibilidad de poder facilitar con proteasas exclusivamente un agente eficaz

para el control de infecciones en plantas útiles y ornamentales.

Además puede contener el agente protector estabilizadores, agentes adhesivos y agentes de expansión, que mejoran las propiedades de aplicación. También pueden estar contenidos en estas mezclas estabilizadores UV y frente
5 a la lluvia habituales.

Esta mezcla se aplica con sistemas de distribución habituales en determinados momentos, que se determinan basándose en la meteorología, sobre el área de cultivo de modo que se humedezcan todas las plantas. La aplicación puede realizarse a temperaturas entre 4 °C y 34 °C y por
10 consiguiente durante todo el periodo de crecimiento. En el cultivo de plantas bajo cristal, la aplicación es en gran parte independiente de la meteorología y las temperaturas se encuentran en el intervalo entre 15 °C y 25 °C. Mediante este tipo de aplicación se garantiza que los preparados enzimáticos sean activos y se impida una infección de la planta por, por ejemplo, las zoosporas
15 de los oomicetos fitopatógenos o por los agentes patógenos bacterianos, tales como *Pseudomonas syringae*. La cantidad de uso por área debe determinarse dependiendo de la planta de cultivo. Actualmente se usan por ejemplo en la viticultura para un área de una hectárea aproximadamente 400 - 800 litros de caldo de pulverización. Los preparados enzimáticos descritos se mezclan de
20 modo que pueda usarse posteriormente la técnica de pulverización convencional.

La invención descrita representa un avance importante con respecto a los agentes y procedimientos establecidos momentáneamente.

Las ventajas con respecto al estado de la técnica se describirán en el
25 presente documento:

- A diferencia de los preparados de cobre u otros productos fitosanitarios químicos, el uso de preparados enzimáticos es inofensivo para el ecosistema, dado que en el suelo se produce una degradación completa del principio activo, no produciéndose su acumulación. Mediante esto se impiden considerables cargas medioambientales.
- No se producen reacciones fitotóxicas, dado que las proteasas usadas de acuerdo con invención no atacan a las superficies de las plantas.
- Las proteasas y otras enzimas siguen siendo eficaces durante el crecimiento de la planta. No se adhieren en un sitio sobre la estructura de la hoja, sino que se distribuyen en una película de líquido sobre la superficie.
- La actividad de las enzimas permanece durante un espacio de tiempo relevante de varios días a pesar de la lluvia y radiación UV. Esta estabilidad puede mejorarse eventualmente mediante formulaciones adecuadas.

Las proteasas, también denominadas peptidasas, escinden enlaces peptídicos en proteínas y favorecen de ese modo su degradación para dar péptidos o aminoácidos. Las proteasas se clasifican en base a su modo de acción en los siguientes grupos: serina-proteasas, EC 3.4.21.-, (S), cisteína-proteasas (C), ácido aspártico-proteasas (A), metaloproteasas (M), y proteasas desconocidas o no clasificadas hasta el momento (Handbook of Proteolytic Enzymes, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner (eds), Academic Press (1998)).

Las proteasas, que se usan preferentemente en sentido de la invención descrita, son sobre todo serinaproteasas. El mecanismo catalítico de esta clase

de enzimas se basa en el grupo hidroxilo nucleófilo del aminoácido serina, que puede escindir enlaces peptídicos. Las enzimas correspondientes pueden obtenerse de sobrenadantes de cultivo, por ejemplo, de microorganismos de los géneros *Nocardiosis* o *Bacillus*. Las correspondientes enzimas pueden
5 prepararse también de manera recombinante. Además, en el caso de las proteasas eficaces puede tratarse también de mutaciones, variantes o fragmentos de las enzimas descritas, que actúan de manera análoga.

La actividad proteasa puede determinarse con cualquier procedimiento de detección, en el que se use un sustrato que contengan los correspondientes
10 enlaces peptídicos (por ejemplo caseína).

Sorprendentemente se encontró que los preparados de proteasa, que se usan por ejemplo en la alimentación de animales, impiden la infección de plantas por oomicetos fitopatógenos y bacterias fitopatógenas. En particular las zoosporas que se producen en el ciclo de los oomicetos, que son las
15 responsables de la verdadera infección del tejido de la hoja, se dañan de manera irreversible mediante la acción de estas enzimas, no llegando la infección de la planta así protegida. El mecanismo de acción contra la infestación bacteriana no está aclarado hasta el momento. La clara acción de estas enzimas no podía esperarse en esta medida, dado que los mecanismos
20 de acción y puntos de ataque de estas enzimas no corresponden con el mecanismo de acción descrito de β -glucanasas o quitinasas. La acción protectora puede reforzarse mediante la combinación con β -glucanasas y/o quitinasas.

Los preparados que pueden obtenerse comercialmente, en los que están
25 contenidas las proteasas descritas, son por ejemplo Ronozyme®ProAct® (DSM

Nutritional Products AG, ejemplos de aplicación 1-9: *Prot III*), en el que está contenida una serinaproteasa de *Nocardioopsis* sp., o Alcalase® (Novozymes AG), que contiene sobre todo una serinaproteasa, subtilisina A, de *Bacillus licheniformis*. Además, los preparados de proteasa seleccionados de la
5 empresa Lumis Enzymes (PAP 2XS), que en tanto que se conoce contiene papaína de la papaya, de la empresa Dyadic (Protease Plus, Protease AP Conc) y de la empresa AB Enzymes (BIOTOUCH ROC 250LC), que en tanto que se conoce contiene una proteasa de Trichoderma, mostraron acción protectora.

10 En el caso de las glucanasas y quitinasas se trata de enzimas que pueden hidrolizar glucanos o quitina. Éstas se asignan a la clase de enzimas E.C. 3.2.1.-, que contiene glicosidasas, o sea enzimas que escinden enlaces O-glicosídicos y S-glicosídicos.

Siguiendo la característica de la enfermedad específica se realiza la
15 aplicación de enzimas contra patógenos de la hoja (por ejemplo falso mildiú o *Pseudomonas syringae*) mediante tratamiento de las partes aéreas de las plantas (por ejemplo mediante tratamiento de pulverización) con concentraciones de un preparado enzimático del 0,001 % - 1 %. Preferentemente se usan las proteasas y glicosilasas en distintas proporciones
20 de mezcla de las enzimas individuales.

La acción de acuerdo con la invención de los preparados enzimáticos, que se manifiesta en el impedimento de la realización de la infección, se consigue debido a que las proteasas se usan individualmente o como mezclas.

Las enzimas se obtienen de sobrenadantes de cultivo de
25 microorganismos. Los componentes se usan preferentemente en medio acuoso

en el intervalo de pH 4,5 a 8,5, preferentemente a pH de 6,0-7,5, para la inactivación de los agentes patógenos. Se usan a una temperatura del agua de 4 °C a 34 °C, preferentemente a de 10 °C a 25 °C.

La invención se explicará en más detalle a continuación mediante
 5 ejemplos. Los ejemplos 1-7 tratan el uso de proteasas como protección frente a oomicetos, mientras que los ejemplos 8 y 9 describen la acción protectora frente a infecciones bacterianas. Como proteasa III se usó Ronozyme®ProAct® (DSM Nutritional Products AG).

Ejemplos

10 Protección frente a la infección de plantas de cultivo por oomicetos

Ejemplo 1

Acción supresora de la infección de aplicación puntual sobre las hojas con preparados enzimáticos que escinden proteínas contra *Plasmopara viticola* en discos de hojas

15 Se trataron una vez discos de hojas de la vid *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau por medio de aplicación de pulverización con distintos preparados enzimáticos que escinden proteínas (proteasa I, II y III), de modo que el lado inferior de la hoja de los discos de hojas usados se humectara de manera uniforme. Los preparados contenían en cada caso una serinaproteasa, que se
 20 obtuvo o bien de una especie del género *Nocardopsis* o *Bacillus*. Los preparados enzimáticos usados para el tratamiento se sometieron a prueba en un intervalo de concentración del 0,01 % al 1% (v/v). El valor de pH de los preparados diluidos en agua se encontraba entre 6 y 7,5. Para el control se pulverizaron los discos de hojas o bien con un producto fitosanitario que
 25 contiene cobre o con agua. 24 horas tras el tratamiento se realizó la infección

artificial de los discos de hojas con *Plasmopara viticola* (aproximadamente 40000 esporas por ml de agua), el agente patógeno del falso mildiú en la vid. A continuación se incubaron los discos de hojas en placas de agar-agua a 22 °C durante seis días en una cámara para plantas con ritmo de día y noche.

- 5 La intensidad de la infestación se calcula a partir de la relación entre la superficie total de la hoja y la superficie de la hoja infectada. Para la evaluación se usó un software de evaluación de imágenes, que distingue entre la superficie total (número de puntos de imagen verdes de los discos de hojas al inicio del ensayo) y superficie infectada (número de puntos de imagen blancos al final del ensayo). Dos de los preparados de proteasa (I, III) sometidos a prueba así como el producto fitosanitario que contiene cobre (Cuprozin) impidieron la infestación y el desarrollo de *Plasmopara viticola* de manera eficaz (intensidad de infestación del 0 %), el tercer preparado, la proteasa II impidió la infestación solo parcialmente (intensidad de infestación del 38 %).
- 10
- 15 Por el contrario, los discos de hojas pulverizados con agua mostraron una clara infestación (véanse la tabla 2 y la figura 1).

Tabla 2:

- Intensidad de infestación (%) calculada a partir de la relación de la superficie total del disco de hoja con respecto a la superficie infectada por disco de hoja tras el tratamiento de discos de hojas con tres preparados de proteasa distintos (n=36)
- 20

	Intensidad de infestación	
	(MW)	Desviación estándar
H ₂ O	87 %	6 %
Cuprozin	0 %	1 %

proteasa I	0 %	1 %
proteasa II	38 %	28 %
proteasa III	0 %	0 %

Ejemplo 2

Acción supresora de la infección de aplicación puntual sobre las hojas con combinaciones de proteasas, quitinasas y preparados enzimáticos que escinden glicósidos contra *Plasmopara viticola* en discos de hojas

Se trataron una vez discos de hojas de la vid *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau por medio de aplicación de pulverización con una combinación de enzimas de proteasa, quitinasa y β -glucanasa en la proporción de mezcla de 1:1:1, de modo que el lado inferior de la hoja de los discos de hojas usados se humectara de manera uniforme. La concentración de los preparados enzimáticos usados ascendía en cada caso al 0,1 % (v/v). El valor de pH de los preparados diluidos en agua se encontraba entre 6 y 7,5. Para el control se pulverizaron los discos de hojas o bien con un producto fitosanitario que contiene cobre o con agua. 24 horas tras el tratamiento se realizó la infección artificial de los discos de hojas con *Plasmopara viticola* (aproximadamente 40000 esporas por ml de agua), el agente patógeno del falso mildiú en la vid. A continuación se incubaron los discos de hojas en placas de agar-agua a 22 °C durante seis días en una cámara para plantas con ritmo de día y noche.

La intensidad de la infestación se calcula a partir de la relación entre la superficie total de la hoja y la superficie de la hoja infectada. Para la evaluación se usó un software de evaluación de imágenes, que distingue entre la superficie total (número de píxeles verdes de los discos de hojas al inicio del

ensayo) y la superficie infectada (número de puntos de imagen blancos). El desarrollo de *Plasmopara viticola* se impidió de manera eficaz en los discos de hojas tratados con enzimas y el producto fitosanitario que contiene cobre.

Ejemplo 3

5 Acción supresora de la infección de aplicación puntual sobre las hojas con preparados enzimáticos que escinden proteínas contra *Plasmopara viticola* en plantas de invernadero

Se trataron una vez vides jóvenes de la especie *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau con ayuda de una unidad de aplicación estacionaria completamente
 10 con un preparado enzimático que escinde proteínas (proteasa III). Las concentraciones del preparado enzimático usado ascendían al 0,1, 0,2 y 0,5 % (v/v). Los valores de pH de los caldos de pulverización se ajustaron entre 6,5 y 7,5. Para el control se pulverizaron otras vides de maceta o bien con un producto fitosanitario que contiene cobre o con agua. 24 horas tras el
 15 tratamiento con el preparado de proteasa se realizó la infección artificial de las hojas con *Plasmopara viticola*, el agente patógeno del falso mildiú en la vid.

A continuación se incubaron las plantas durante una semana en el invernadero a 20 °C. La infestación se indicó mediante registro visual de la proporción (%) de modificaciones patológicas o necróticas en hojas/tallos en la
 20 masa total de una planta por repetición (100 %) y se documentó mediante fotografía. Se usó una escala de evaluación visual con las clasificaciones 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 90, 100 % de modificaciones patológicas.

El desarrollo y la propagación de *Plasmopara viticola* en las hojas tratadas con proteasa III y el producto fitosanitario que contiene cobre se impidió
 25 eficazmente, mientras que las hojas pulverizadas con agua mostraban una

infestación alta (fig. 2).

Ejemplo 4

Acción supresora de la infección de aplicación periódica con preparados enzimáticos que escinden proteínas en ensayos en campo contra *Plasmopara*

5 *viticola*

Todas las vides de la especie *Vitis vinifera* cv. Pinot noir azul se trataron de manera repetida con ayuda de un pulverizador de túnel con un preparado enzimático que escinde proteínas (Prot III) durante la temporada en intervalos de 8 a 14 días, de modo que la superficie de las vides se humectara de manera
10 uniforme. La concentración del preparado enzimático usado ascendía al 0,1 % (v/v). Los valores de pH de los caldos de pulverización se ajustaron entre 6,5 y 7,5. Para la mejor humectación de las hojas se añadió a la solución de pulverización aún un agente de humectación (TREND 90).

Al final de la temporada se realizó la evaluación visual de las intensidades
15 de infestación y la frecuencia de infestación del falso mildiú en hojas y uvas. El desarrollo de *Plasmopara viticola* se impidió de manera eficaz en las vides en campo.

Ejemplo 5

Acción protectora de preparados enzimáticos que escinden proteínas contra el
20 agente patógeno del tizón tardío y la podredumbre seca (*Phytophthora infestans*) en plantas de tomate

Se pulverizaron tomates de la especie Red Robin en el estadio de 4 hojas con el preparado de proteasa (proteasa III, 0,1 % (v/v). Los valores de pH de los caldos de pulverización se ajustaron entre 6,5 y 7,5. Como variantes
25 adicionales se añadieron a la solución de proteasa agentes humectantes

usuales (T/S forte, Biomaxima, Nufilm) con una concentración del 0,02 % (v/v). Como control interno sirvió el preparado de cobre comercial Atempo y agua. Por variante se aplicaron 5 repeticiones con en cada caso una planta.

24 horas tras la aplicación de enzimas se realizó la inoculación artificial con el agente patógeno *Phytophthora infestans* con una concentración de esporangios de 80.000 esporas por ml. Por planta se usaron en cada caso 6 ml de suspensión. Las plantas se colocaron a aproximadamente 16 °C y un 100 % de humedad relativa del aire sin iluminación en la incubadora. Tras 24 horas se ajustó un ritmo de iluminación de 16:8 y se desconectó el humidificador del aire.

La evaluación visual tuvo lugar 6 días tras la infección. La infestación se indicó mediante registro visual de la proporción (%) de modificaciones patológicas o necróticas en hojas y tallos en la masa total de una planta y se documentó mediante fotografía (tabla 3).

Tabla 3:

Infestación mediante *Phytophthora infestans* y grado de acción del preparado de proteasa

N.º	Variante	Infestación [%] Valor promedio (desviación estándar)	Grado de acción [%]
1	Proteasa III	12,00 (2,74)	87,50
2	Proteasa III + T/S-Forte	18,00 (2,74)	81,25
3	Proteasa III + BioMaxima	11,00 (5,48)	88,54
4	Proteasa III + Nufilm P	12,00 (2,74)	87,50

N.º	Variante	Infestación [%] Valor promedio (desviación estándar)	Grado de acción [%]
5	Atempo (producto de referencia de cobre)	1,80 (1,79)	98,13
6	Agua-control	96,00 (5,48)	0,00

Las plantas que se trataron con proteasa III mostraban una protección estable con un grado de acción del 81-87 % con respecto al grado de acción de un patrón de cobre habitual. Los coadyuvantes de formulación, tales como TS-
 5 Forte, BioMaxima y NufilmP, no condujeron al aumento de la acción en comparación con la variante 1.

Ejemplo 6

Acción protectora de preparados enzimáticos que escinden proteínas contra *Pseudoperonospora cubensis* en plantas de pepino

10 Se pusieron plantas de pepino en una cámara climatizada. Para la detección de la acción protectora de proteasas se aplicaron por pulverización aproximadamente 6 ml del preparado de proteasa (Prot III), que se encontraba en una solución acuosa con la concentración del 0,1 %, en los lados inferiores de las hojas. Los valores de pH de los caldos de pulverización se ajustaron
 15 entre 6,5 y 7,5. Como controles sirvió un preparado de cobre habitual (Cuprozin Progress) y agua. Por variante se aplicaron 6 repeticiones con en cada caso una planta. Un día tras la aplicación de enzima se infectaron las plantas de ensayo con *Pseudoperonospora cubensis* (75000 esporas por ml). La incubación se realizó a temperatura ambiente en un invernadero con una

humedad del aire relativa superior al 95 %. Durante las primeras 48 horas se incubaron las plantas en la oscuridad, después se mantuvieron las plantas en el ritmo de día/noche de 16/8 horas. La evaluación visual se realizó 10 días tras la infección. A este respecto se determinó la infestación porcentual de las plantas. Mediante el uso del preparado Prot III pudo reducirse la infestación a menos del 4 % (tabla 4).

Tabla 4:

Infestación mediante *Pseudoperonospora cubensis* en % y grado de acción del preparado de proteasa

N.º	Variante	Infestación [%] Valor promedio (desviación estándar)	Grado de acción [%]
1	Proteasa III	3,6 (0,4)	94,1
5	Cuprozin Progress (patrón de cobre)	9,0 (4,7)	85,2
6	Agua	60,4 (11,9)	0,00

10

Ejemplo 7

Comparación de la acción reguladora de distintos preparados de proteasa contra *Pseudoperonospora cubensis* en plantas de pepino

Se pusieron plantas de pepino en una cámara climatizada. Para la comparación del grado de acción de distintos preparados de proteasa se aplicaron por pulverización aproximadamente 6 ml del respectivo preparado de proteasa (Prot III - Prot IX), que se encontraba en una solución acuosa con la concentración del 0,1 %, en los lados inferiores de las hojas. Los valores de pH

15

de los caldos de pulverización se ajustaron entre 6,5 y 7,5. Como controles sirvió un preparado de cobre habitual (Cuprozin Progress) y agua. Por variante se aplicaron 6 repeticiones con en cada caso una planta. Un día tras la aplicación de enzima se infectaron las plantas de ensayo con

5 *Pseudoperonospora cubensis*. La incubación se realizó a temperatura ambiente en un invernadero con una humedad del aire relativa superior al 95 %. Durante las primeras 48 horas se incubaron las plantas en la oscuridad, después se mantuvieron las plantas en el ritmo de día/noche de 16/8 horas. La evaluación visual se realizó 10 días tras la infección. A este respecto se determinó la

10 infestación porcentual de las plantas. El grado de acción de los preparados individuales está representado en la tabla 5. El preparado con la mejor acción era la proteasa III. Las proteasas IV, VIII y IX tienen una acción comparable. En la tabla 5 está representado, en tanto que se conozca, el organismo de origen de la respectiva proteasa.

15 **Tabla 5:**

Resumen de los preparados de proteasa usados en el experimento, así como la infestación y los correspondientes grados de acción

ID de muestra	Origen	Producto	Infestación [%]	Grado de acción [%]
			valor promedio (desviación estándar)	
Prot III	Nocardiosis	Ronozyme	0,4 (0,4)	98,6
		ProAct		
Prot IV	Bacillus	Alcalasa	0,5 (0,4)	98,3
Prot V	Bacillus	Savinasa	9,8 (4,8)	65,8

Prot VI	Aspergillus	Flavourzima	35,0 (21 ,5)	---
Prot VIII	Papaya	PAP 2XS	0,8 (0,3)	97,2
Prot IX	Bacillus	proteasa AP	1,0 (0,6)	98,5
		Conc		
fungicida	---	Cuprozin	7,4 (6,2)	74
de cobre		Progress		

Protección frente a la infección de plantas de cultivo por bacterias

Ejemplo 8

Ensayo de placas para la detección de la acción inhibidora del crecimiento de proteasa frente a *Clavibacter michiganensis*

Un cultivo de *Clavibacter michiganensis* se aplicó hasta la fase de log tardío y se diluyó de manera correspondiente hasta obtener $DO_{600nm} = 1,0$ en una solución de NaCl 10 mM. Este cultivo de partida se colocó en placas de agar nutriente en respectivamente 12 diluciones de 10^{-1} a 10^{-12} , que contenían el preparado proteasa III en las concentraciones del 0,01 - 1 %. Dos placas control estaban libres de proteasa III y mostraron el crecimiento máximo de *Clavibacter michiganensis* en las condiciones indicadas (figura 3, izquierda: 10^{-5}). A partir de una concentración de proteasa del 0,05 %, se inhibió claramente el crecimiento bacteriano, dado se hicieron crecer solo las diluciones de mayor concentración (de 10^{-1} a 10^{-3} , véase la figura 3). El gran potencial de la proteasa III como producto fitosanitario para el control del marchitamiento del tomate bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) se vuelve evidente mediante este ensayo.

Ejemplo 9

Protección de plantas de tomate frente a infección por *Pseudomonas syringae*

Para este ensayo se pulverizaron plantas de tomate de la especie “Red Robin” con una solución de proteasa al 0,1 % (proteasa III) con y sin adición de un agente de adhesión (NufilmP) y se incubaron a 22 °C durante 24 horas. El
 5 valor de pH de los caldos de pulverización se ajustó hasta de 6,5 a 7,5. Como control sirvió en cada caso 4 plantas que se pulverizaron con agua corriente o un agente de comparación. 24 horas tras la aplicación de enzimas se infectó las plantas con *Pseudomonas syringae*.

Las primeras muestras de segmentos de hojas de 0,7 cm² de tamaño se
 10 extrajeron dos horas tras la inoculación, otras muestras se extrajeron 7, 14 y 21 días tras la inoculación. En el análisis entraron en cada caso 4 segmentos de hojas de 4 hojas individuales de 4 plantas. El número de las unidades formadoras de colonia (UFC) por segmento de hoja se encontraba en el momento de partida a 1×10^3 . En el control (agua) aumentaba el número de las
 15 UFC en el intervalo de tres semanas hasta aproximadamente 1×10^6 UFC por segmento de hoja. Las plantas tratadas con proteasa III mantuvieron el nivel del inicio del ensayo (10^3 UFC por hoja) durante las primeras dos semanas. Tras tres semanas se redujo el número de UFC por hoja en las hojas tratadas con proteasa significativamente hasta 10 UFC por segmento de hoja (figura 4).
 20 La proteasa usada era claramente más eficaz que la sustancia de comparación.

Bibliografía:

- DE LA FUENTE, L. and BURDMAN, S. 2011. Pathogenic and beneficial plant-associated bacteria. En Agricultural Sciences, [Ed. Rattan Lal], en
 25 Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the

Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK,
[<http://www.eolss.net>]

- DE MARCO, J.L; VALADARES-INGLIS, M.C. and CR. FELIX, 2003:
Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with
antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of
witches' broom of cocoa. Brazilian J. Microbiol. 34, 33 - 38
- KASSEMAYER H.-H. (2004) Proyecto de investigación para el programa
del Ministerio federal para la protección de los consumidores,
alimentación y agricultura para promover proyectos de investigación y
desarrollo así como para la transferencia de la tecnología y el
conocimiento a la agricultura ecológica. "Innovationen zur Verbesserung
der Rahmenbedingungen für den ökologischen Weinbau. Erarbeitung
von wissenschaftlichen Ansätzen zur biologischen Kontrolle der
Rebenperonospora und für Strategien zu deren Regulierung im
ökologischen Weinbau", número proyecto 020E269, Instituto de
Viticultura Estatal de Friburgo
- KUDO, S. and C. TESHIMA, 1991: Enzyme activities and antifungal
action of fertilization envelope extract from fish eggs. The Journal of
Experimental Zoology 259, 392 - 398
- KUDO, S., 1992: Enzymatic basis for protection of fish embryos by the
fertilization envelope. Experientia 48, 277 – 281
- KUDO, S., 2000: Enzymes responsible for the bactericidal effect in
extracts of vitelline and fertilization envelopes of rainbow trout eggs.
Zygote 8, 257 - 265
- KÜCÜK, C. and M. KIVANC 2002: Isolation of *Trichoderma* spp. and

determination of their antifungal, biochemical and physiological features.
Türk. J. Biol. 27, 247-253

- MALATHRAKIS, N.E., GOUMAS, D.E. 1999: Fungal and bacterial diseases. Véase referencia 4, pág. 34-47.
- 5 • MÜNCH, S., NEUHAUS, J.M., BOLLER, T., KEMMERLING, B. and K.H. KOEHL 1997: Expression of β -1,3-glucanase and chitinase in healthy, stem rust-affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing Sr5 or Sr24-specific rust resistance. *Planta* 201, 235-244
- OERKE, E.C.H. und U. STEINER 1996: Ertragsverluste und
10 Pflanzenschutz: Die Anbausituation für die wirtschaftlich wichtigsten Kulturen. Serie de documentos de la Sociedad Alemana de Fitomedicina, Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart
- PAULITZ, T.C. BELANGER, R.R. 2001 : Biological control in greenhouse Systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 103-133
- 15 • POWELL, K. A., JUTSUM, A. R. (1993) Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pestic. Sci.* 37, 315-321.
- SCALA F., S.L. WOO, I. GARCIA, A. ZOINA, E. FILIPPONE, J.-A. PINTOR- TORO, G. DEL SORBO, B. ALOJ and M. LORITO. 1998. Transgenic tobacco and potato plants expressing antifungal genes from
20 *Trichoderma* are resistant to several plant pathogenic fungi. 7º Congreso Internacional de Patología Vegetal, 9-16 de agosto de 1998, Edimburgo, Escocia, Offered Papers Abstracts - volumen 3: 5.3.10.
- WO 2004/002574 A1 Biopract GmbH, Berlín; Instituto LEIBNIZ para la ecología del agua y pesca de agua dulce en la asociación de
25 investigación Berlín e.V. Verfahren zur Prophylaxe und Therapie von

Mykosen bei Fischen und Wirbellosen und deren Entwicklungsstadien.
(Extinción)

- DE 10 2205 048 520 Biopract GmbH, Berlín GmbH, Instituto para el cultivo de hortalizas y plantas ornamentales Großbeeren/Erfurt.

5 Verfahren zur Prophylaxe und Therapie von Mykosen bei Nutz- und Zierpflanzen sowie bei Gehölzen, insbesondere in hydroponischen Systemen, 07.10.2007

Leyendas de las figuras

Figura 1: Discos de hojas tratados con agua (A), producto fitosanitario
10 que contiene cobre (B), proteasa I (C), proteasa II (D) o proteasa III (E).

Figura 2: Ensayo de actividad de Prot III en vid de maceta Müller-Thurgau. Está representada la intensidad de infestación de *P. viticola* en las variantes tratadas con proteasa III 0,01 % - 0,5 % en comparación con el patrón interno, control de agua y el producto de referencia de cobre. La intensidad de
15 la infestación se impidió de manea eficaz mediante el uso de Prot III. La infestación elevada en plantas tratadas con Prot III al 0,5 % (*) se originó mediante una sombra de pulverización sobre una hoja individual. La intensidad de infestación se calculó basándose en la infestación porcentual de en cada caso 6 plantas con hasta 6 hojas por variante.

20 **Figura 3:** Representación de la acción inhibidora de la proteasa III sobre el crecimiento de *C. michigenensis*. Están representadas series de dilución de un cultivo bacteriano en distintas concentraciones de proteasa III. Los números debajo de las placas de agar aclaran la etapa de dilución hasta la que hayan crecido las bacterias.

25 **Figura 4:** Proliferación de bacterias *P. syringea* en segmentos de hojas

de tomate durante 21 días tras la inoculación. Las plantas de tomate se trataron de manea simulada (blanco), o se pulverizaron con proteasa III o con proteasa III en Nufilm-P. Las unidades formadoras de colonia (UFC) se aislaron de segmentos de hojas de 0,7 cm² y se contaron tras una incubación de 48 horas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la profilaxis de infecciones en plantas útiles y ornamentales, preferentemente en la viticultura, **caracterizado por que** las
5 plantas se pulverizan de manera adecuada con una solución acuosa de una proteasa sola o en combinación con glicosilasas, preferentemente β -glucanasas y/o quitinasa.
2. Procedimiento para la profilaxis de infecciones por hongos, en particular
10 oomicetos en plantas útiles y ornamentales según la reivindicación 1, en particular por peronospora de la vid, **caracterizado por que** las plantas se pulverizan de manera adecuada con una solución acuosa de una proteasa sola o en combinación con glicosilasas, preferentemente β -glucanasas y/o quitinasa.
- 15 3. Procedimiento para la profilaxis de infecciones bacterianas en plantas útiles y ornamentales según la reivindicación 1, preferentemente en la fruticultura y la horticultura, **caracterizado por que** las plantas se pulverizan de manera adecuada con una solución acuosa de una proteasa sola o en combinación con glicosilasas, preferentemente β -glucanasas y/o quitinasa.
20
4. Procedimiento para la profilaxis de infecciones bacterianas en plantas útiles y ornamentales según la reivindicación 3, en particular del marchitamiento bacteriano, **caracterizado por que** las plantas se pulverizan de
25 combinación con glicosilasas, preferentemente β -glucanasas y/o quitinasa.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el preparado enzimático contiene una proteasa sola o una combinación de proteasas.
- 5 6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el preparado enzimático contiene una proteasa en combinación con glicosilasas, preferentemente β -glucanasas y/o quitinasa.
7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que**
10 como proteasas se usan preferentemente serinaproteasas bacterianas, que se derivan de representantes de las especies *Nocardiosis* sp. o *Bacillus* sp.
8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** como proteasas se usan preferentemente proteasas de hongos filamentosos,
15 en particular de *Trichoderma* ssp.
9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** como proteasas se usan preferentemente proteasas que se obtienen de frutas tropicales tales como papaya o piña.
20
10. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** los preparados enzimáticos se aplican en la lucha contra agentes patógenos en una dosis del 0,001 % - 1 %, preferentemente del 0,01 % - 0,1 %.
- 25 11. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado por que**

se realiza un tratamiento en intervalos temporales de las plantas preferentemente mediante tratamiento de pulverización de las partes aéreas de las plantas.

- 5 12. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado por que** los preparados enzimáticos se usan con valores de pH de 4,0 - 8,0, preferentemente con valores de pH de 4,5 a 7,5.
- 10 13. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado por que** los preparados enzimáticos se usan a temperaturas de 4 a 34 °C, preferentemente de 20 a 32 °C.
- 15 14. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado por que** los preparados enzimáticos se formulan con agentes adhesivos y humectantes así como con estabilizadores (por ejemplo trisiloxanos modificados, fosfatidilcolinas modificadas, etoxilatos, ácidos grasos naturales, ácidos orgánicos, alcoholes grasos, alcanoles).
- 20 15. Agente para la realización del procedimiento según las reivindicaciones 1 a 14.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Procedimiento para la profilaxis de infecciones en plantas útiles y ornamentales, preferentemente en la viticultura, **caracterizado por que** las
5 plantas se pulverizan de manera adecuada con una solución acuosa de una proteasa bacteriana.
2. Procedimiento para la profilaxis de infecciones por oomicetos, en particular *Plasmopara viticola*, *Phytophthora infestans*, *Pseudoperonospora*
10 *cubensis* y *Pseudoperonospora humuli*, en plantas útiles y ornamentales según la reivindicación 1, **caracterizado por que** las plantas se pulverizan de manera adecuada con una solución acuosa de una proteasa bacteriana.
3. Procedimiento para la profilaxis de infecciones bacterianas en plantas
15 útiles y ornamentales según la reivindicación 1, preferentemente en la fruticultura y la horticultura, **caracterizado por que** las plantas se pulverizan de manera adecuada con una solución acuosa de una proteasa bacteriana.
4. Procedimiento para la profilaxis de infecciones bacterianas en plantas
20 útiles y ornamentales según la reivindicación 3, en particular mediante *Pseudomonas syringae* y *Clavibacter michiganensis*, **caracterizado por que** las plantas se pulverizan de manera adecuada con una solución acuosa de una proteasa bacteriana.
- 25 5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que**

el preparado enzimático contiene una proteasa bacteriana sola o una combinación de proteasas bacterianas.

6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que**
5 como proteasas se usan preferentemente serinaproteasas bacterianas.
7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que**
como proteasas se usan preferentemente serinaproteasas bacterianas del tipo
de quimiotripsina.
- 10 8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que**
como proteasas se usan preferentemente serinaproteasas bacterianas, que se
derivan de representantes de las especies *Nocardiosis* sp. o *Bacillus* sp.
- 15 9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que**
los preparados enzimáticos se aplican en la lucha contra agentes patógenos en
una dosis del 0,001 % - 1 %, preferentemente del 0,01 % - 0,1 %.
- 20 10. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por que**
se realiza un tratamiento en intervalos temporales de las plantas
preferentemente mediante tratamiento de pulverización de las partes aéreas de
las plantas.
- 25 11. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado por que**
los preparados enzimáticos se usan con valores de pH de 4,0 - 8,0,

preferentemente con valores de pH de 4,5 a 7,5.

12. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado por que**
los preparados enzimáticos se usan a temperaturas de 4 a 34 °C,
5 preferentemente de 18 a 32 °C.

13. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado por que**
los preparados enzimáticos se formulan con agentes adhesivos y humectantes
así como con estabilizadores (por ejemplo trisiloxanos modificados,
10 fosfatidilcolinas modificadas, etoxilatos, ácidos grasos naturales, ácidos
orgánicos, alcoholes grasos, alcanoles).

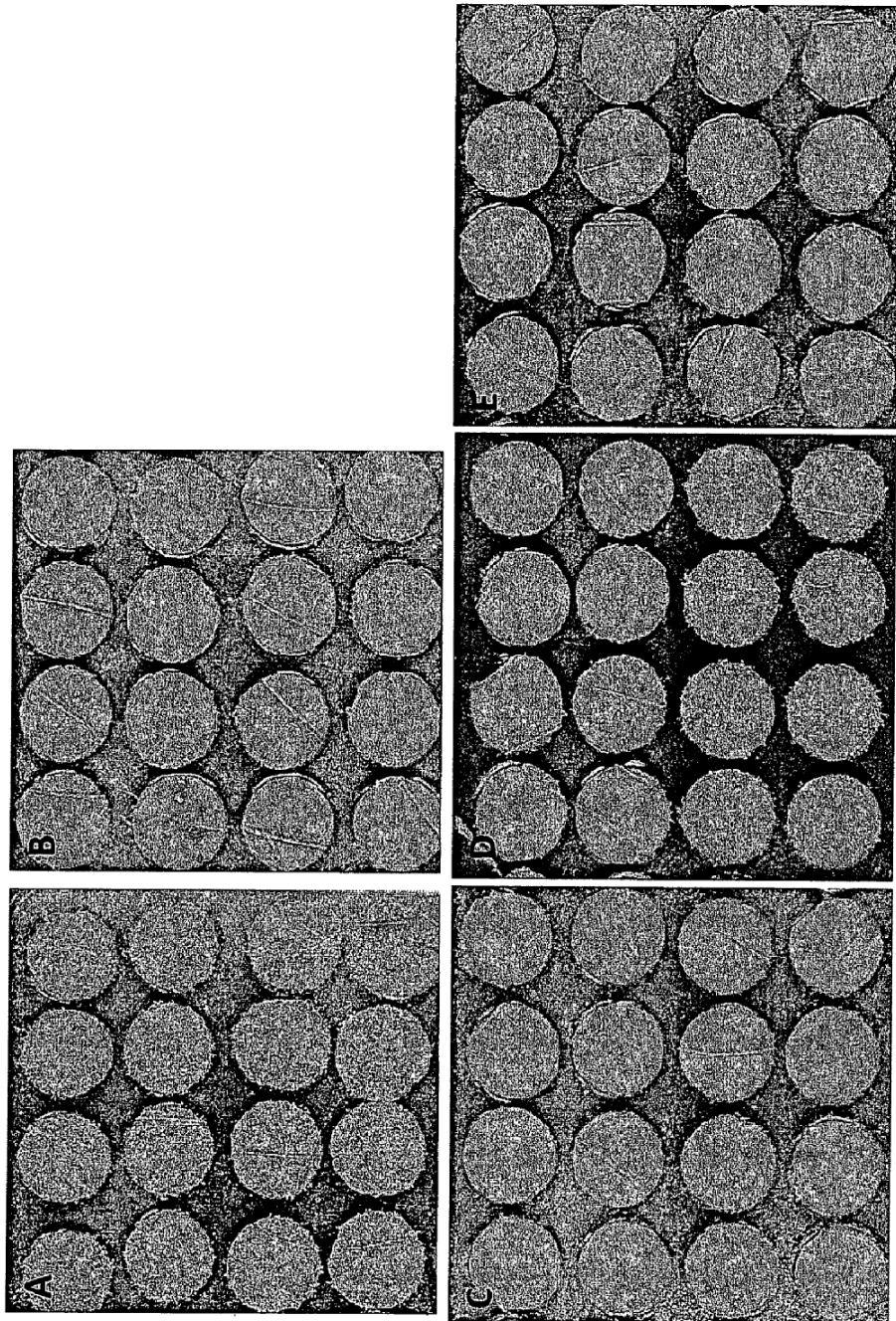
14. Agente para la realización del procedimiento según las reivindicaciones 1 a
13.
15

RESUMEN

PROCEDIMIENTO PARA LA PROFILAXIS DE INFECCIONES EN PLANTAS ÚTILES Y ORNAMENTALES, PREFERENTEMENTE EN LA VITICULTURA, ASÍ COMO EN PLANTAS LEÑOSAS

La invención se refiere a un procedimiento para la profilaxis de infecciones por hongos, en particular por oomicetos, e infecciones bacterianas en plantas útiles y ornamentales. Los campos de aplicación son la viticultura, la fruticultura, la horticultura y el cultivo de plantas ornamentales. La invención se basa en el objetivo de desarrollar un procedimiento para la profilaxis de infecciones por hongos, en particular por oomicetos, e infecciones bacterianas, en particular por el falso mildiú (*Peronosporales*) y *Pseudomonas syringae* en la viticultura y la horticultura. Sorprendentemente, se encontró que las proteasas seleccionadas solas y en combinación con enzimas de acción complementaria impiden de manera eficaz la infección de plantas por determinados organismos fitopatógenos. La infección de la planta protegida no llega a producirse. Debido a esto se impide una propagación del patógeno en la población de plantas. El procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado por que se prepara una solución acuosa de una proteasa sola o en combinación con β -glucanasas y/o quitinasas, se dota de agentes de estabilización, agentes adhesivos y agentes humectantes, y se aplica sobre las plantas con procedimientos convencionales varias veces durante el periodo vegetativo, preferentemente antes de las fases de alto riesgo de infección condicionadas por la meteorología.

Figura 1



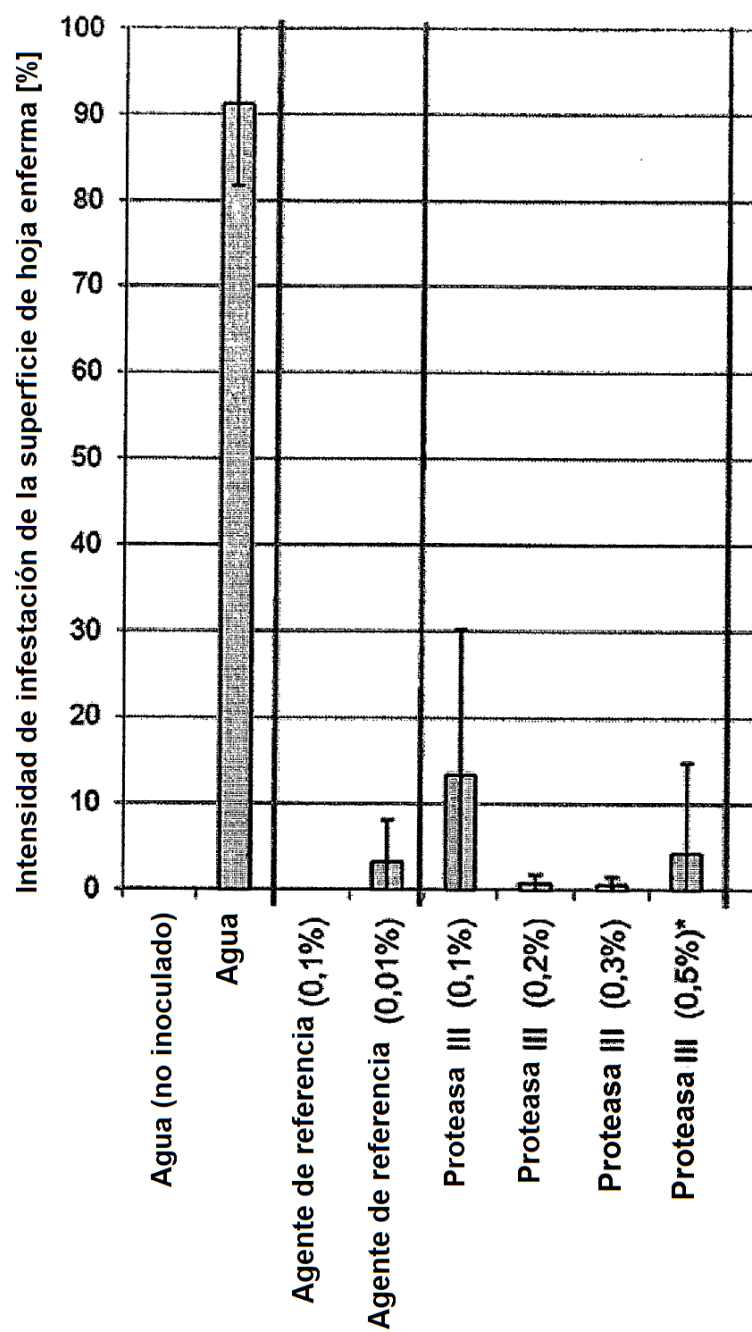


Figura 2

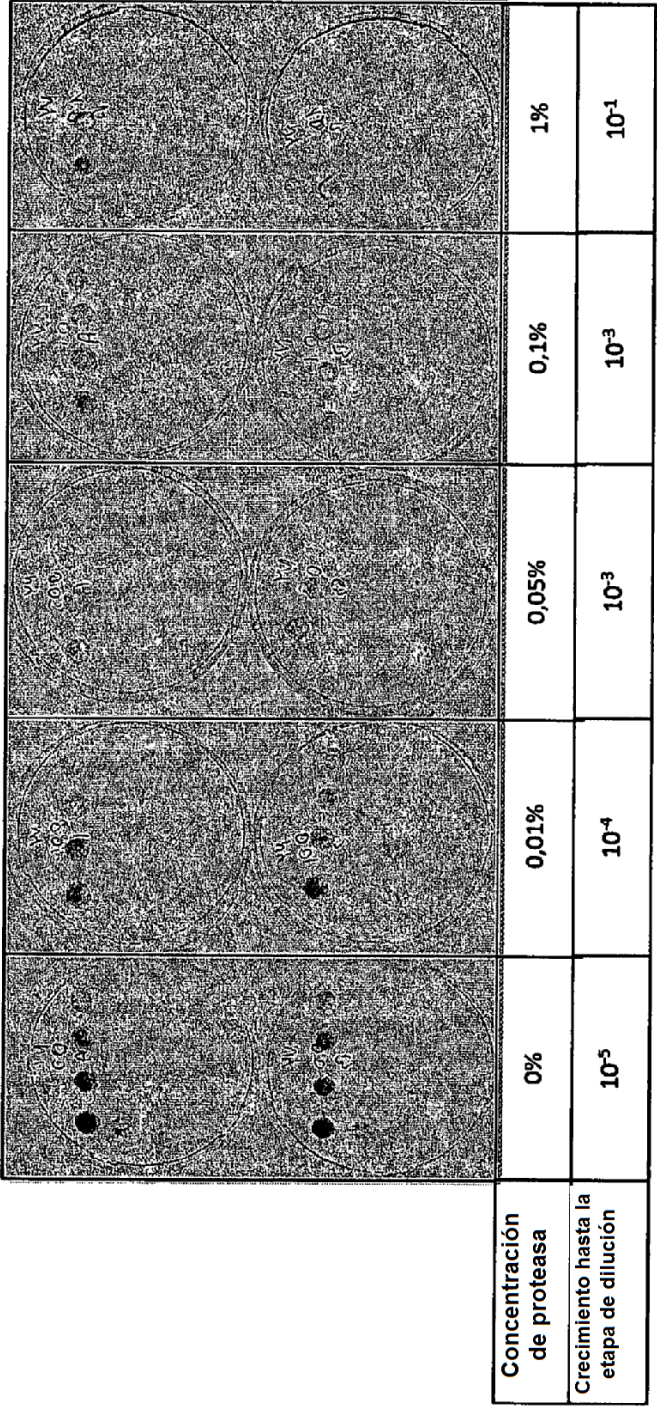


Figura 3

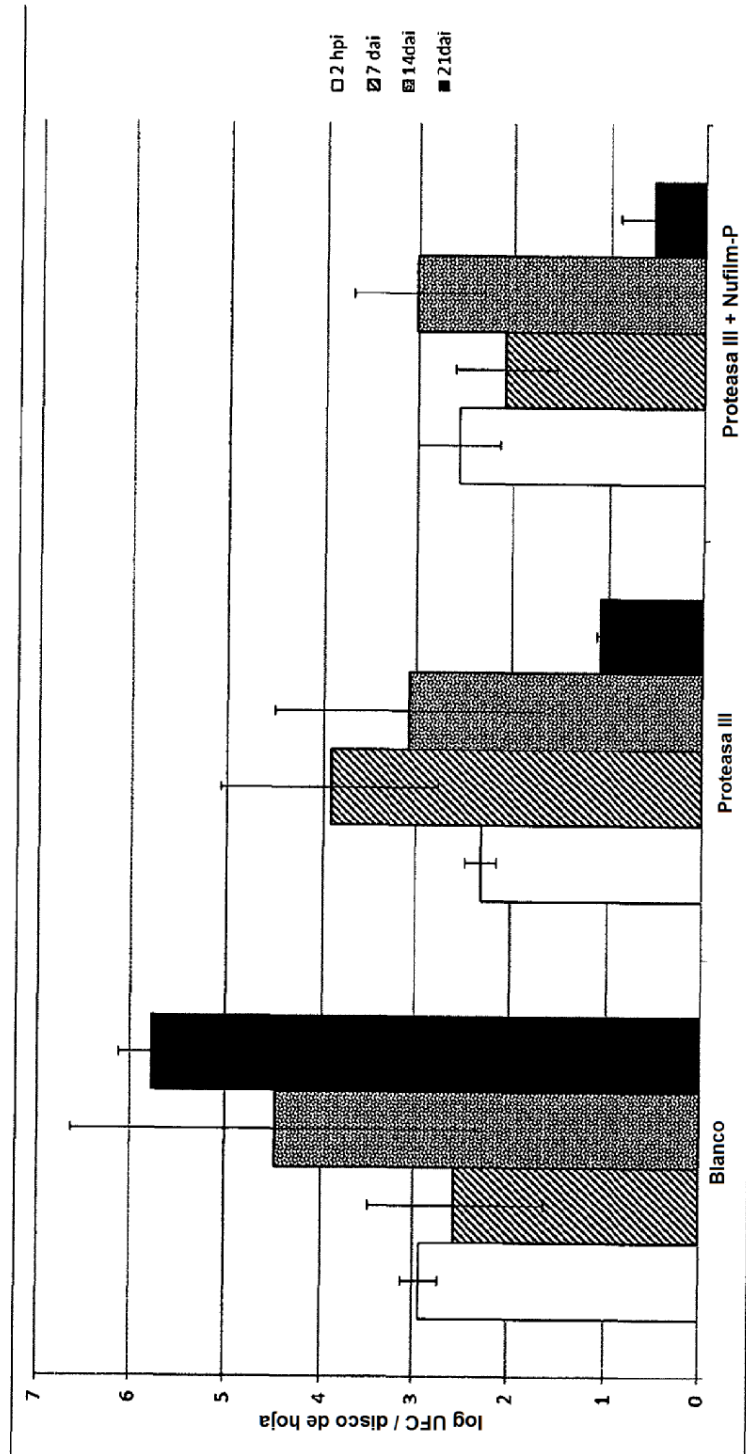


Figura 4