

**COMPOSICIONES ANTIMICROBIANAS Y MÉTODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES
DE LAS PLANTAS**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 No aplicable

**DECLARACIÓN RELATIVA A LA INVESTIGACIÓN O EL DESARROLLO
PATROCINADOS POR EL GOBIERNO FEDERAL**

No aplicable

10 **LOS NOMBRES DE LAS PARTES DE UN ACUERDO DE INVESTIGACIÓN
CONJUNTA**

No aplicable

**INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA DE MATERIAL PRESENTADO EN UN
DISCO COMPACTO O COMO ARCHIVO DE TEXTO A TRAVÉS DEL SISTEMA DE
ARCHIVO ELECTRÓNICO DE LA OFICINA**

15 No aplicable

**DECLARACIÓN SOBRE DIVULGACIONES ANTERIORES DEL INVENTOR O
COINVENTOR**

No aplicable

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 (1) Campo técnico de la invención

Las enfermedades bacterianas de las plantas perennes han sido motivo de preocupación para la agricultura durante muchos años. Las enfermedades bacterianas se propagan rápidamente, a menudo por el viento, la lluvia o el vector de un insecto. Cuando las condiciones son favorables, estos patógenos bacterianos pueden crecer rápidamente y causar daños irreversibles a un cultivo. Cabe destacar las especies bacterianas colonizadoras del tejido vascular. Debido a una tasa de crecimiento relativamente lenta, es posible que estos

patógenos no se detecten hasta pasadas varias temporadas de crecimiento y que ya hayan empezado a afectar negativamente a la salud de los árboles y las vides. Dado que las plantas perennes necesitan varios años para alcanzar la productividad, cualquier colonización por un patógeno bacteriano tendrá implicaciones a largo plazo en la viabilidad económica del cultivo.

- 5 Aunque no son exhaustivos, *Erwinia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Xylophilus spp.*, *Xylella spp.*, *Candidatus Liberibacter spp.*, y *Rickettsia spp.* son patógenos representativos difíciles de controlar que requieren un uso extensivo de antibióticos foliares e insecticidas para mejorar la productividad de las plantas y limitar su propagación.

- Entre los patógenos más difíciles de mitigar y controlar se encuentran las especies bacterianas colonizadoras vasculares: *Candidatus Liberibacter spp.*, un patógeno bacteriano colonizador del floema que es el agente causal de la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos/HLB (por sus siglas en inglés), y *Xylella fastidiosa*, una bacteria colonizadora del xilema que es el agente causal de la enfermedad de Pierce en las uvas, la enfermedad de la quemadura de la hoja del cafeto en las plantas de café, la clorosis variegada de los cítricos en los cítricos, y el síndrome de decaimiento rápido del olivo en las aceitunas. Dado que estos organismos residen en el tejido vascular de estas especies perennes, su control es difícil debido a la falta de antimicrobianos o mecanismos de suministro efectivos. Las prácticas de control habituales incluyen aplicaciones foliares de antimicrobianos, que no penetran bien en el follaje y no se movilizan bien a través del tejido vascular, control de insectos vectores, uso de portainjertos o variedades resistentes limitadas, aumento de las aplicaciones de fertilizantes para intentar superar las enfermedades o, en casos dramáticos y costosos, eliminación de las plantas infectadas y replantación. En el caso de las plantas vectorizadas por insectos, los títulos bacterianos iniciales tras la infección son bajos, pero pueden alcanzar hasta 10 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de tejido fresco. Cuando se multiplican por el tamaño de las raíces, las ramas y el follaje correspondiente, el número de colonias bacterianas dentro del árbol puede parecer abrumador.

- La divulgación se refiere a composiciones antimicrobianas y más particularmente a nuevas composiciones antimicrobianas y métodos para tratar enfermedades de las plantas. La presente invención da a conocer nuevas composiciones antimicrobianas y métodos para su uso en el tratamiento de infecciones por *Liberibacter* en plantas, y en particular infecciones de *Candidatus Liberibacter africanas*, *Candidatus Liberibacter americanas*, y *Candidatus Liberibacter asiaticus*, o mutantes de las mismas en cítricos, en donde causan lo que comúnmente se conoce como enfermedad del enverdecimiento de los cítricos. Esta invención también se puede usar para controlar otros patógenos bacterianos perennes vasculares o que

habitan en los tejidos, incluidos *Xylella spp.*, *Erwinia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Xylophilus spp.*, y *Rickettsia spp.*

(2) Descripción de la técnica relacionada, incluida la información divulgada en virtud de 37 CFR 1.97 y 1.98.

5 La técnica anterior se refiere a composiciones antimicrobianas. Las composiciones antimicrobianas del estado de la técnica para tratar la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos pueden comprender soluciones de antibióticos de tetraciclina y penetrantes de corteza a un pH de 5,5-6,5 y soluciones de auxinas y citocininas a un pH de 5-7 aplicadas por pulverización sobre las plantas y el suelo, ampicilina formulada a un pH de 6,5 o líquidos
10 obtenidos a partir de cultivos de *Paenibacillus polymyxa* a un pH de 6,0 aplicados por inyección, y microorganismos beneficiosos y sus productos de fermentación aplicados a las hojas, los frutos, las semillas y el suelo. La técnica anterior también divulga métodos para formar capas protectoras en las plantas, en donde las capas protectoras comprenden antibióticos que pueden prevenir infecciones. Lo que falta en la técnica anterior es una
15 composición antibiótica con un pH menor a 4,0, y más particularmente un pH de 1,8-2,5, que se pueda administrar a la red vascular de un árbol de cítricos para tratar la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Una modalidad de la divulgación satisface las necesidades presentadas anteriormente al
20 comprender generalmente un disolvente en el que se disuelve sustancialmente un antibiótico para lograr una concentración del antibiótico suficiente para tratar una infección bacteriana en una planta. Se añade un ácido al disolvente a una concentración suficiente para generar un pH en el rango de 1,5 a menos de 4,0. Así pues, la composición antimicrobiana se configura para el suministro sistémico a una planta con el fin de tratar una enfermedad bacteriana que
25 afecte a la planta.

Así pues, se han esbozado, de forma bastante general, los atributos más importantes de la divulgación para que la descripción detallada de la misma que sigue se pueda entender mejor, y para que la presente contribución a la técnica se pueda apreciar mejor. Existen atributos adicionales de la divulgación que se describirán más adelante y que constituirán el
30 objeto de las reivindicaciones adjuntas.

Los objetos de la divulgación, junto con los diversos rasgos de novedad que

caracterizan la divulgación, se señalan con particularidad en las reivindicaciones anexas y que forman parte de la presente divulgación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La divulgación se entenderá mejor y otros objetos distintos de los expuestos anteriormente se harán evidentes cuando se considere la siguiente descripción detallada de la misma. Tal descripción hace referencia a los dibujos anexos, en donde:

La Figura 1 es una imagen representativa de un naranjo de Valencia tratado por inyección con una solución de oxitetraciclina acidificada a pH 2.

10 La Figura 2 es una imagen representativa de un naranjo de Valencia tratado por pulverización foliar con una solución de oxitetraciclina sin acidificar.

La Figura 3 es una imagen representativa de un naranjo de Valencia tratado por inyección con una solución de estreptomicina acidificada a pH 2.

La Figura 4 es una imagen representativa de un naranjo de Valencia tratado por pulverización foliar con una solución de estreptomicina no acidificada.

15 La Figura 5 es una imagen representativa de un naranjo de Valencia sin tratar.

La Figura 6 es un diagrama de flujo para un método para generar una solución antibiótica acidificada y su uso en el tratamiento de una infección bacteriana en una planta de acuerdo con una modalidad de la divulgación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Con referencia ahora a la Figura 1, se describirá una nueva composición antimicrobiana que incorpora los principios y conceptos de una modalidad de la divulgación y un método.

25 La composición antimicrobiana comprende generalmente un disolvente en el que se disuelve sustancialmente un antibiótico para alcanzar una concentración del antibiótico suficiente para tratar una infección bacteriana en una planta. El disolvente generalmente comprende agua, pero también puede incluir cosolventes, tales como, pero no limitados a, alcoholes, dimetilsulfóxido, y similares. El antibiótico puede comprender una tetraciclina, un aminoglucósido, o similares, y así se configura para tratar una infección por *Candidatus Liberibacter africanas*, una infección por *Candidatus Liberibacter americanas*, o una infección

por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en un cítrico. El antibiótico tetraciclina puede comprender tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, demeclociclina, limeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina, rolitetraciclina, doxiciclina, tigeciclina, eravaciclina, sareciclina, oromadaciclina, o similares. El antibiótico aminoglucósido puede comprender

5 kanamicina A, amikacina, tobramicina, dibekacina, gentamicina, sisomicina, netilmicina, neomicina B, neomicina C, neomicina E, estreptomicina, plazomicina, o similares. El antibiótico puede tener una concentración de 500 a 50.000 partes por millón. El antibiótico puede tener una concentración de 500 a 25.000 partes por millón. El antibiótico puede tener una concentración de 500 a 12.000 partes por millón.

- 10 Un ácido está presente en el disolvente a una concentración suficiente para generar un pH en un rango de 1,5 a menos de 4,0. El ácido puede estar presente en una concentración suficiente para generar un pH en el rango de 1,8-2,5. El ácido puede comprender un ácido inorgánico, aunque la presente invención también contempla que el ácido comprenda un ácido orgánico, o una combinación de un ácido inorgánico y un ácido orgánico. El ácido puede
- 15 comprender ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido acético, ácido cítrico, o similares.

- La composición antimicrobiana se configura para el suministro sistémico a una planta, de modo tal que el antibiótico se configura para tratar una enfermedad bacteriana que afecta a la planta. La composición antimicrobiana se puede configurar para inyectarse en la red
- 20 vascular de un árbol o una vid.

- La presente invención anticipa un método (Figura 6) de generación de una solución antibiótica acidificada y su uso en el tratamiento de una infección bacteriana en una planta. El método comprende un primer paso de adición de un antibiótico a un disolvente en una cantidad suficiente para generar una primera solución con una concentración del antibiótico
- 25 suficiente para tratar una infección bacteriana en una planta. Un segundo paso del método consiste en titular la primera solución usando un ácido para generar una segunda solución con un pH en el rango de 1,5 a menos de 4,0. Un tercer paso del método consiste en perforar un agujero en el tronco de un árbol o una vid. Un cuarto paso del método consiste en inyectar la segunda solución en una red vascular del árbol o la vid. Como será evidente para los
- 30 expertos en la técnica, el orden de adición del antibiótico y del ácido al disolvente se puede invertir una vez determinadas las cantidades de cada uno de ellos necesarias para alcanzar el pH deseado de la solución de antibiótico.

A continuación se presentan ejemplos detallados de las composiciones

antimicrobianas para el tratamiento de enfermedades de las plantas y métodos para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas en plantas. Estos ejemplos no se deben considerar limitativos en cuanto a composiciones, métodos de preparación y uso, o especies vegetales.

5 I. Definiciones

Índices de vigor de los árboles: 1 = Vigor más bajo; 5 = Vigor más alto. LSD (por sus siglas en inglés) significa diferencia mínima significativa y CV significa coeficiente de varianza. “a” indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga la letra “a”. Similarmente, “b” indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga la letra “b”.

II. Ensayos con naranjos de Valencia

A. Oxitetraciclina

En la Tabla 1 se presentan los resultados de este estudio. Para el Tratamiento 1, se preparó una solución de 5.500 ppm de oxitetraciclina (sal de HCl, > 95 %) usando agua destilada. Posteriormente, esta solución se acidificó hasta pH 2 con ácido clorhídrico. A cada árbol (n = 9) se le inyectaron 50 mL de la solución, suministrando 0,275 gramos de oxitetraciclina-HCl. Para el Tratamiento 2, se disolvieron 2,5 g de oxitetraciclina (sal de HCl, > 95 %) en 7,57 L [2 galones] de agua. La solución resultante se pulverizó sobre el follaje de los árboles a razón de 0,95 L [1 cuarto de galón] (0,3125 g de oxitetraciclina-HCl) por árbol (n = 9). Las calificaciones de vigor se realizaron 60 días después de la aplicación de los tratamientos.

Conclusiones del ensayo: Las soluciones de oxitetraciclina acidificadas a pH 2 y administradas por inyección en el tronco fueron más efectivas que las soluciones de oxitetraciclina sin acidificar aplicadas al follaje por pulverización.

Tabla 1

No. de Tratamiento	Tratamiento	Calificación del vigor (1-5)
1	Oxitetraciclina - solución HCl, inyectada	3,39 a

2	Oxitetraciclina - solución acuosa, pulverizada	2,67 b
LSD P = 0,05		0,477

B. Estreptomycin

En la Tabla 1 se presentan los resultados de este estudio. Para el Tratamiento 1, se preparó una solución de 5.500 ppm de estreptomycin (sal de sulfato, > 98 %) usando agua destilada. Posteriormente, esta solución se acidificó hasta pH 2 con ácido clorhídrico. A cada árbol (n = 9) se le inyectaron 50 mL de la solución con 0,275 g de estreptomycin-SO₄. Para el Tratamiento 2, se disolvieron 4,12 g de estreptomycin (sal de sulfato, > 98 %) en 7,57 L [2 galones] de agua. La solución resultante se pulverizó sobre el follaje de los árboles a razón de 0,95 L [1 cuarto de galón] (0,515 g de estreptomycin-SO₄) por árbol (n = 9). Las calificaciones de vigor se realizaron 60 días después de la aplicación de los tratamientos.

- 10 Conclusiones del ensayo: Las soluciones de estreptomycin acidificadas a pH 2 y administradas por inyección en el tronco fueron más efectivas que las soluciones de estreptomycin sin acidificar aplicadas al follaje por pulverización.

Tabla 2

No. de Tratamiento	Tratamiento	Calificación del vigor (1-5)
1	Estreptomycin - solución HCl, inyectada	3,61 a
2	Estreptomycin - solución acuosa, pulverizada	2,94 b
LSD P = 0,05		0,512

- 15 La Tabla 3 representa un ejemplo práctico de dosificación de una cantidad deseada de antimicrobiano en un árbol o una vid. Entre los factores que podrían alterar la dosificación se encuentran la salud general de la planta, es decir, una disminución de la biomasa vascular causada por el patógeno, la cobertura y la poda, y factores ambientales, tales como la temperatura, la humedad y el estrés.

Tabla 3

Diámetro del tronco (cm [pulgadas])	Antibiótico (PPM)	Volumen inyectado (mL)	Antibiótico (g por árbol/vid)
3,18-4,45 [1,25-1,75]	550-1.100	25	0,014-0,028
4,45-5,39 [1,75-2,12]	550-2.200	50	0,027-0,11
5,39-7,62 [2,12-3,00]	5.500-11.000	25	0,14-0,28
7,62-10,80 [3,00-4,25]	5.500-11.000	50	0,28-0,55
10,80-15,24 [4,25-6,00]	5.500-11.000	100	0,55-1,10
> 15,24 [> 6,00]	5.500-11.000	200	1,10-2,20

En general, el volumen de tratamiento inyectado sería proporcional al diámetro del tronco de un árbol. Los árboles con redes vasculares dañadas por enfermedades se tratarían a concentraciones más bajas para evitar la fitotoxicidad. A medida que los árboles se recuperan, se puede aumentar la concentración para mitigar el riesgo de reinfección.

5 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad y comprensión, será fácilmente evidente, a la luz de las enseñanzas de esta invención, que ciertos cambios y modificaciones se pueden hacer a la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las siguientes reivindicaciones.

10 Por lo tanto, lo anterior se considera únicamente ilustrativo de los principios de la divulgación. Además, puesto que las modificaciones y los cambios numerosos ocurrirán fácilmente para aquellos expertos en la técnica, no se desea limitar la divulgación a las composiciones y a los métodos exactos del uso, y por consiguiente, se puede recurrir a todas

las modificaciones y equivalentes convenientes, cayendo dentro del alcance de la divulgación. En este documento de patente, la palabra “que comprende” se usa en su sentido no limitante para significar que los artículos que siguen a la palabra están incluidos, pero los artículos no mencionados específicamente no están excluidos. La referencia a un elemento por el artículo

5 indefinido “a” no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto exija claramente que solamente haya uno de los elementos.