

TÍTULO DE PATENTE NO. 341145

Titular(es): JESUS CAMPOS GARCIA; JOSE LOPEZ BUCIO; RANDY ORTIZ;

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

Domicilio: Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Edif. B-3, Ciudad Universitaria,

Av. Francisco J. Mujica S/N, 58030, Morelia, Michoacán, MÉXICO; Santiago Tapia

403, Col. Centro, 58000, Morelia, Michoacán, MÉXICO.

Denominación: CICLODIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD AUXÍNICA REGULADORES DEL

CRECIMIENTO VEGETAL.

Clasificación: Int.Cl.8: A01N37/10; A01N43/00; A01N47/08; A61K38/00; C07K14/00

Inventor(es): JESUS CAMPOS GARCIA; JOSE LOPEZ BUCIO; RANDY ORTIZ CASTRO.

SOLICITUD

Número: Fecha de presentación:

MX/a/2012/004547 10 de abril de 2012 10:30

PRIORIDAD

País: Fecha: Número:

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 10 de abril de 2032

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

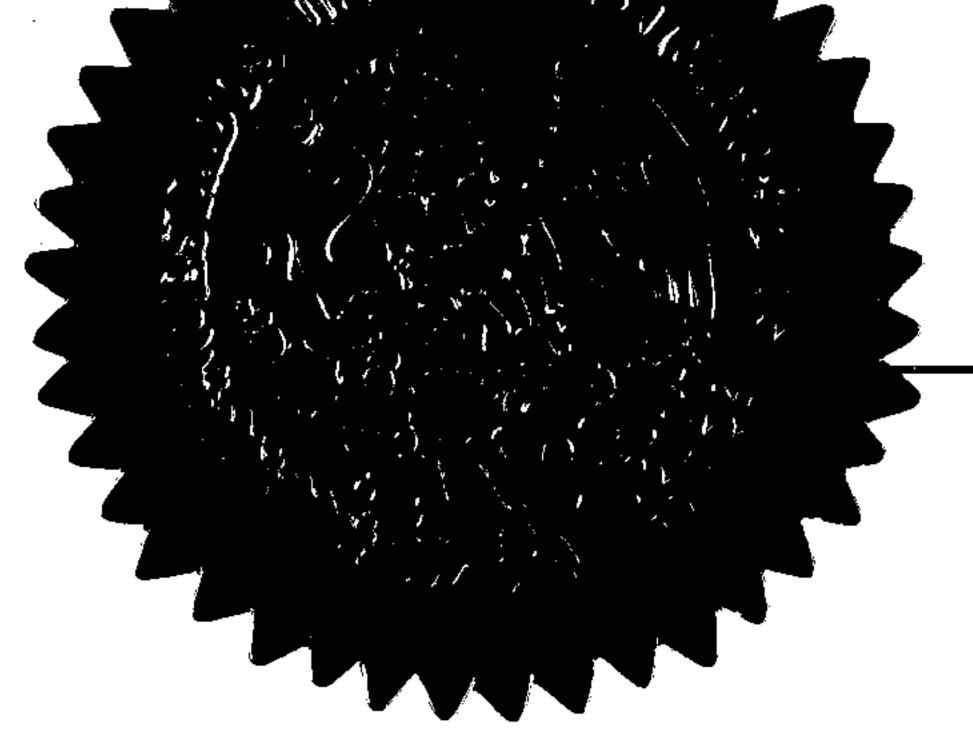
Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009,06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 7 de agosto de 2016

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES

4---

NAHANNY CANAL REYES

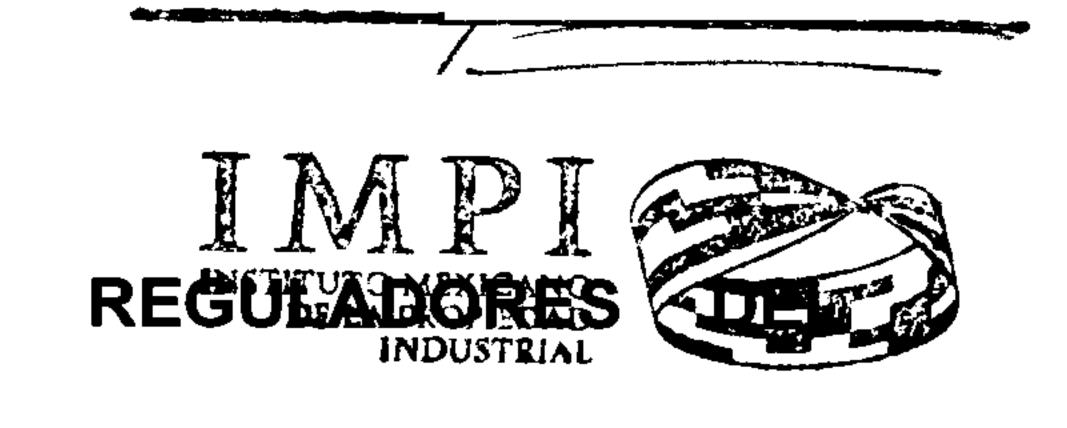


Arenal No. 550, Piso 1.
Col. Pueblo Santa María Tepepan,
Xochimilco, C.P. 16020,
Ciudad de México
Tel. (55) 53 34 07 00 www.impi.gob.mx



MX/2016/69548

TÍTULO DE LA PATENTE



CICLODIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD AUXÍNICA CRECIMIENTO VEGETAL.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a ciclodipéptidos con actividad auxínica como reguladores y promotores del crecimiento vegetal. En particular la presente invención se refiere al efecto promotor del crecimiento vegetal causado por los ciclodipéptidos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) con actividad auxínica.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- Las bacterias utilizan moléculas pequeñas como señales químicas para la comunicación celular, esta comunicación necesita la producción, liberación y detección de factores hormonales, conocidos como autoinductores. Esto les permite a las bacterias coordinar la expresión de genes dependientes de la densidad poblacional, en un proceso comúnmente denominado como Quorum-Sensing (QS).
- Uno de los primeros sistemas de quorum-sensing descritos es el de *Vibrio fischeri* una bacteria marina bioluminiscente que se encuentra asociada en simbiosis con organismos marinos abismales incluyendo peces y calamares. El sistema de quorum-sensing en *V. fischeri* está regulado por dos proteínas, Luxl y LuxR, que controlan la expresión del operón de la luciferasa (*luxICDABE*) requeridas para la producción de luz.

Diversas especies de bacterias Gram negativas usan *N*-acil composetina (AHLs) para regular su QS, estos compuestos contienen un anillo homoserina lactona (HL) conservado, el cual se encuentra unido principalmente a una cadena (*N*)-acil de ácido graso unida a través de un enlace amida. La longitud de la cadena de ácidos grasos puede variar entre 4 a 18 carbonos, usualmente por incrementos de 2 carbonos. Estos pueden estar saturados o insaturados y con o sin sustituyentes en el carbono 3 (C-3).

Pseudomonas aeruginosa es uno de los ejemplos más estudiados del sistema de QS, en esta bacteria se han identificado dos sistemas jerárquicos: los cuales están comprendidos por los sistemas LasR-LasI y el RhIR-RhII, regulados por 3-oxododecanoil-HL (3-oxo-C12-HL) y butanoil-HL (C4-HL), respectivamente.

10

15

20

Diversos procesos en las bacterias están regulados por QS, incluyendo la simbiosis, la virulencia, la producción de antibióticos y la formación de biopelículas. *P. aeruginosa* es una bacteria Gram negativa aislada del suelo, agua y plantas y es un patógeno oportunista en humanos infectando pacientes inmunocomprometidos o en pacientes con infecciones crónicas pulmonares como la fibrosis quística. Además puede infectar otros organismos como insectos, nematodos y plantas. Esta facilidad de infección de *P. aeruginosa* es debido a la producción de factores de virulencia, mecanismos de resistencia a multidrogas y formación de biopelículas. En *P. aeruginosa* al menos el20% de los genes están sujetos a la regulación por el QS.

Las bacterias asociadas a plantas son capaces de comunicarse por medio de AHLs, lo que ha planteado la posibilidad de que las plantas son capaces de reconocer estos compuestos y responder ajustando su metabolismo.

en 2003 [Mathesius U., S. Mulders, M. Gao, M. Teplitski, G. Caetano-Anollés, B.G.

Un primer reporte indicando que las plantas pueden percibir las Altes que

Rolfe y W.D. Bauer. (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. Proceedings of the National Academic of Sciences USA 100:1444-1449], donde se muestra que la aplicación de AHLs afecta un rango amplio de funciones en *Medicago truncatula*, incluyendo respuestas de defensa y respuesta a estrés, regulación transcripcional, procesamiento de proteínas, respuestas a hormonas de la planta y sobre elementos de citoesqueleto, así como también el metabolismo primario y secundario de la planta.

10

15

20

Posteriormente se encontró que la presencia de bacterias productoras de AHLs en la rizósfera de tomate induce respuestas de defensa dependientes de ácido salicílico y etileno, las cuales juegan un papel importante en la activación de resistencia sistémica en plantas y confiere resistencia al hongo patógeno *Alternaria alternata* [Schuhegger R., Ihring A., Gantner S., Bahnweg G., Knappe C., Vogg G., Hutzler P., Schmid M., Van Breusegem F., Eber L., Hartmann A. & Langebartels C. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizospheric bacteria. Plant Cell and Environment 29:909-918]. El hecho de que ciertas mutantes de *Rhizobium* alteradas en la producción o respuesta a AHLs fueron incapaces de nodular plantas de leguminosas respalda la hipótesis de que las AHLs pueden participar en las interacciones planta-bacteria [Zheng H., Zhong Z., Lai X., Chen W.X., Li S. & Zhu J. (2006). A luxR/luxl-type quorum-sensing system in a plant bacterium *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation. Journal of Bacteriology 188:1943-1949].

En un estudio reciente se demostró que pequeñas concentraciones del Alfraciano causar cambios sustanciales en la arquitectura del sistema radioular de Arabidopsis thaliana, [Ortiz-Castro R., M. Martínez-Trujillo y J. López-Bucio. (2008) N-acyl-L-homoserine lactones: A class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell and Environment 31:1497-1509]. Quedando la necesidad de esclarecer si las AHLs son la única clase de compuestos del QS que son capaces de modular el desarrollo de las plantas y de establecer si regulando el QS en bacterias promotoras del crecimiento vegetal se puede favorecer la producción de compuestos promotores del crecimiento vegetal por parte de las bacterias de la rizósfera.

10

15

20

Los ciclodipéptidos, también referidos como dipéptidos cíclicos o dicetopiperazinas - cuyos términos serán referidos en el presente documento de manera indistinta-, constituyen una numerosa familia de compuestos con amplio rango de usos, que van desde aditivos alimenticios (Patentes US 4,006,261), en la industria cosmética (Patente US 7,347,991), antibacterianos, antifúngicos, antivirales y con actividades inmunosupresoras y antitumorales (publicado en la Patente US 7,237,082). Los ciclodipepétidos son producidos por diferentes microorganismos tales como bacterias, hongos filamentosos, levaduras y líquenes, aunque también se han aislado de organismos marinos tales como esponjas y estrellas de mar.

Adicionalmente, se ha encontrado que los ciclodipéptidos tienen actividad biológica sobre plantas. La patente US 5,446,021 describe una composición de uso agrícola para inducir resistencia en plantas al estrés hídrico y salino que comprende como ingrediente activo a ciclodipéptidos. En fracciones de sobrenadantes de cultivos de

Pseudomonas putida WCS358 con actividad promotora de internacion predominantemente ciclidipéptidos, lo cual suglere que son los responsables del efecto promotor del crecimiento vegetal inducido por la bacteria [Degrassi G, Aguilar C, Bosco M, Zahariev S, Venturi V (2002). Plant growth-promoting Pseudomonas putida WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. Curr Microbiol 45:250–254]. La solicitud de patente WO2012008781 se refiere a una composición agrícola con derivados de 2,5-dicetopiperazinas con capacidad de controlar enfermedades vegetales y promover el desarrollo vegetal. Con esto se establece que existen compuestos producidos por las bacterias diferentes a las AHLs con capacidad de regular el crecimiento vegetal, pero queda la necesidad de determinar si regulando el QS se puede incrementar la producción de compuestos microbianos capaces de promover el crecimiento vegetal y establecer los mecanismos a través de los cuales las plantas los perciben.

10

15

20

El crecimiento y desarrollo de las plantas involucra la integración de diversas señales endógenas y ambientales que, junto con el programa genético intrínseco, determinan la forma y funcionamiento de los diferentes tejidos, incluyendo la raíz. Las plantas cuentan con un sistema sofisticado para integrar información del ambiente y para responder activamente a los estímulos bióticos y abióticos, de igual manera, poseen mecanismos para la comunicación entre los diferentes órganos y tejidos. Virtualmente cada aspecto del desarrollo de la planta desde la embriogénesis hasta la senescencia está sujeto a una regulación química mediada por diferentes

substancias reguladoras del crecimiento vegetal conocidas conditioner de la propiedad hormonas vegetales.

Las fitohormonas más estudiadas son las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico, el ácido jasmónico, el etileno y más recientemente los brasinosteroides. Todas las anteriores son moléculas orgánicas pequeñas las cuales actúan a bajas concentraciones. Estas se sintetizan en los diferentes tejidos de la planta y pueden transportarse a otros tejidos a través del sistema vascular (como el caso de las auxinas) o difundirse libremente a través de las membranas como el etileno [Gray W.M. (2004). Hormonal Regulation of plant growth and development. PLoS Biol 2:1270-1273.].

Respecto a la aplicación de fitohormonas únicamente en el desarrollo vegetal, las más importantes son la estimulación de la elongación y diferenciación celular inducidas por auxinas y giberelinas, el efecto de las citocininas, auxinas y giberelinas en la división celular y el efecto de auxinas y citocininas en la diferenciación de órganos (Patente US 8,101,552).

10

15

20

Las fitohormonas tienen valor comercial en la agricultura y la horticultura. Una lista limitada de aplicaciones relacionadas a la estimulación del desarrollo incluyen el mejoramiento de las uvas sin semilla por el ácido giberélico (GA), el desarrollo de frutas cartenocárpicas por las auxinas, la inducción de raíces en la propagación por auxinas, etc., por lo que el aislamiento de compuestos naturales con capacidades de regular el desarrollo vegetal, como los de la presente invención, tienen también un potencial valor comercial.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN DE LA INVENCIÓN DE LA PROPIEDAD DE LA PROPIEDAD INDIESTRIAL

La presente invención se refiere a tres ciclodipétidos con actividad auxínica, aislados de cultivos microbianos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 con capacidad promotora del crecimiento vegetal. Los ciclodipéptidos de la presente invención fueron identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y su estructura confirmada por resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (¹H-NMR y ¹³C-NMR, respectivamente). Los ciclodipéptidos de la presente invención son el ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) todos con actividad auxínica y responsables de la actividad promotora del crecimiento vegetal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

10

15

20

Figura 1. Efecto de la inoculación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre el desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Fotografías representativas de plantas crecidas durante 12 días en condiciones control (A), o co-inoculadas con *P. aeruginosa* silvestre (B) y la mutante de *P. aeruginosa LasI* (C).

Figura 2. Gráficas representativas del efecto de la co-inoculación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre la producción de biomasa en *Arabidopsis thaliana*. Se midieron y se graficaron el peso fresco del follaje (A) y el peso fresco de la raíz (B) de plantas crecidas en medio sin inocular (barras blancas) y plantas co-inoculadas con *P. aeruginosa* silvestre (barras negras) y la mutante de *P. aeruginosa lasl* (barras grises). Los números en el eje de las Y en ambas gráficas representan el peso en miligramos; en el eje de las X se grafican los tratamientos A, B y C,

respectivamente. Los datos graficados son la media ± la desviación estanda de la recepción de la desviación de la desv

Figura 3. Cromatograma representativo del HPLC semi-preparativo del sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*. A) Las flechas indican los picos colectados que fueron evaluados para su actividad promotora de crecimiento vegetal. B) Cromatograma representativo del resultado de la purificación, este ejemplo corresponde a la purificación del pico 7, presentando un enriquecimiento > 90%. Se grafica en el eje de las Y la abundancia relativa en % y en el eje de las X, el tiempo de retención en minutos para (A y B) o la masa molecular del ión (M/Z) para (C).

10

15

20

Figura 4. Análisis cromatográfico de la fracción purificada de ciclodipéptidos presentes en el extracto de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto total obtenido de sobrenadantes de cultivos de *P. aeruginosa* por la extracción con acetato de etilo acidificado, sometido posteriormente a análisis por GC-MS. A) Perfil cromatográfico (GC-MS) del extracto total sin purificar. B) Fracción purificada por HPLC semi-preparativo (proceso referido en la figura 3B) sometida al análisis por GC-MS. C) Perfil de fragmentación iónica obtenida por espectrometría de masas, correspondiente al pico purificado de la figura 3B (ciclo L-Pro-L-Phe). El análisis fue realizado en un cromatografo de gases Agilent 6850 Series II, equipado con detector de masas Agilent MS detector (modelo 5973) y una columna capilar de 30m×0.2mm×0.25mm de 5% phenylmethylsiloxane (Agilent). En todas las gráficas se indica en el eje de las Y la abundancia relativa en mV y en el eje de las X, tiempo de retención para (A y B) o la masa molecular del ión (M/Z) para (C).

Figura 5. Espectro de masas de las fracciones purificada por le propier de la propier

Figura 6. Estructura de los ciclo-dipéptidos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe), purificados de *Pseudomonas aeruginosa*; de acuerdo con la interpretación de los datos obtenidos en sus análisis moleculares. Los análisis corresponden a Espectrometría de Masas (MS), Resonancia Nuclear Magnética de Hidrógeno (¹H-NMR) y Resonancia Nuclear Magnética de Carbono-13 (¹³C-NMR). Espectros se realizaron a fracciones purificadas (1 mg) disueltas en CDCl₃ y analizadas en un RMN-magneto Varian Mercury Plus 400 MHz para ¹H-NMR y Varian Mercury Plus 100 para ¹³C-NMR. Los números indican la posición de cada átomo en la molécula identificada.

10

15

20

A) Ciclo (L-Pro-L-Tyr) [Pico 6, Rt=7 min]: masa del ión molecular 260 (m/z), formula molecular $C_{14}H_{16}N_2O_3$. [m/z (%): 260(8), 154(100), 125(3), 107(50), 77(5), 70(18), 41(2)]. Datos de ¹H-RNM: 1.85–2.10(3H,m,Pro4-Ha,b,Pro3-Ha); 2.4(1H,m,Pro3-Hb); 2.74(1H,dd,J=10.6,14.7Hz, Tyr10-Ha); 3.40–3.70(3H,m, Pro5-Ha,b,Tyr-10-HbtoTyr10-Hb); 4.09(1H,bt,J=7.7Hz,ProH-6); 4.22(1H,dd,J=2.2, 10.6Hz,TyrH-9); 5.72(1H,bs,NH); 5.95(1H,bs,OH); 6.82(2H,d,J=8.2Hz,H-3',5'Tyr); 7.07(2H,d,J=8.2Hz,H-TyrPhe). Datos de ¹³C-RNM: 165(C-1), 45.4(C-3), 22.5(C-4),

28.3(C-5), 59.1(C-6), 169.6(C-7), 56.2(C-9), 35.9(C-10), 127.3(C 1/3) 16.1(C-3) 130.3(C-2', C-6'), 155.3(C-4').

B) Ciclo (L-Pro-L-Val) [Pico 7, Rt=7.5 min]: masa del ión molecular 196 (m/z), formula molecular: C₁₀H₁₆N₂O₂ [m/z (%): 196(2), 154(100), 138(6), 125(35), 110(7), 98(7), 72(30), 70(65), 55(9), 41(12)]. Datos de ¹H-RNM: 0.91(3H,d,J=6.9HzCH3-Val); 1.06(3H,d,J=6.9HzCH3-Val); 1.88–2.18(3H,m,Pro4-Ha,b,Pro3-Ha); 2.39(1H,m,Pro3-Hb); 2.63(1H,m,ValH-10); 3.50–3.75(2H,m,Pro5-Ha,b); 3.95(1H,bs,ValH-9); 4.09(1H,bt,J=6.9Hz,ProH-6); 5.70(1H,bs,NH). Datos de ¹³C-RNM: 164.8(C-1), 45.1(C-3), 22.4(C-4), 28.3(C-5), 60.3(C-6), 169.9(C-7), 56.8(C-9), 28.5(C-10), 16(C-11), 19.3(C-12).

10

- C) Ciclo (L-Pro-L-Phe) [Pico 8, Rt=12 min]: masa del ión molecular 244 (m/z), formula molecular C₁₄H₁₆N₂O₂ [m/z(%): 244(58), 153(48), 125(100), 120(20), 103(6), 91(42), 70(40), 55(5), 41(6)]. Datos de ¹H-RNM: 1.85–2.10(3H,m,Pro4-Ha,b,Pro3-Ha); 2.34(1H,m,Pro3-Hb); 2.78(1H,dd,J=10.6,14.0Hz,Phe10-Ha); 3.55–3.73(3H,m,Pro5-Ha,b,Phe10-Hb); 4.09(1H,bt,J=7.3Hz,ProH-6); 4.28(1H,dd,J=2.2, 10.6Hz, PheH-9); 5.62(1H,bs,NH); 7.22–7.38(5H,m,Phe). Datos de ¹³C-RNM: 165(C-1), 45.5(C-3), 22.6(C-4), 28.3(C-5), 59.1(C-6), 169.4(C-7), 56.2(C-9), 36.8(C-10), 135.9(C-1'), 129.3(C-3',C-5'), 129.1(C-2',C-6'), 127.6(C-4').
 - Figura 7. Tinción de β–glucoronidasa (GUS) de la raíz primaria de plantas de la línea transgénica de *Arabidopsis thalina DR5:uidA* sembradas y crecidas durante 8 días, en placas con medio MS suplementado con agar en presencia de solvente (A), con 3 μM de ácido 3-indol acético (AIA, la principal auxina natural) (B), co-inoculada con *P. aeruginosa* WT (C) o con la mutante *P. aeruginosa lasl* (D). Efecto de las

concentraciones indicadas de AIA (E) o de los ciclodipéptidos purificados sobre la expresión del gene *DR5:uidA* (F). Las fotografías muestran representantes individuales de al menos 30 plantas teñidas. (Barra de escala = 500 µm).

Figura 8. Efecto de la aplicación del extracto de *Pseudomonas aeruginosa* conteniendo mayoritariamente los ciclodipéptidos: ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) sobre el desarrollo de plantulas de *Zea mays*. Fotografías representativas de plantas crecidas en medio MS líquido en presencia de 0.1-1.0 μM (micromolar), preferentemente 0.4 μM de la mezcla de ciclodipéptidos. Plantulas de maíz crecidas en condiciones control (A), o en presencia de la mezcla de los ciclodipéptidos procedentes de *P. aeruginosa* (B). Acercamiento de las plántulas de *Zea mays*, control (C) y tratados con la mezcla de ciclodipéptidos procedentes de *P. aeruginosa* (D).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se entenderá mejor mediante los siguientes ejemplos.

10

15

20

EJEMPLO 1. Pseudomonas aeruginosa como promotora del crecimiento vegetal. P. aeruginosa ha sido usada como un modelo bacteriano para entender la regulación del QS regulado por las AHLs. P. aeruginosa tiene principalmente dos sistemas de QS dependientes de AHL, los sistemas las y rhl. En el sistema las, la sintasa de AHL LasI dirige la síntesis de 3-oxo-C12-AHL, la cual interacciona con el factor transcripcional LasR para unirse a los promotores de los genes dependientes de éste sistema. En el sistema rhl, la sintasa RhlI dirige la síntesis de C4-AHL, la cual interacciona con el regulador RhIR y controla la transcripción de genes blanco. Se

evaluó el efecto in vivo de P. aeruginosa sobre el crecimiento veget mediantes co-inoculación de plantas de Arabidopsis thaliana de 4 días de edad crecidas en medios Murashige and Skoog (MS) 0.2x con alrededor de 2.8 x 10° cfu de P. aeruginosa PAO1 tipo silvestre y la mutante de P. aeruginosa afectada en las sintasa de AHLs lasl, mediante un estriado de la bacteria sobre la superficie del medio a una distancia de la punta de la raíz de 1 cm (Figura 1). Después de 12 días de crecimiento en presencia del cultivo de bacteria, se observó un significante incremento en la producción de biomasa en follaje (Figura 2A) de alrededor del 135% y de la raíz (Figura 2B) de alrededor del 60% cuando las plantas son co-inoculadas con la cepa silvestre, comparado con las plantas no co-inoculadas. Sorprendentemente, cuando las plantas son co-inoculadas con las mutantes en la sintasa LasI, el incremento en la biomasa del follaje es de alrededor del 235 % (Figura 2A) y el de raíz es de alrededor del 650 % (Figura 2B). Estos incrementos en la biomasa se correlacionan con una alterada arquitectura del sistema radicular de A. thaliana. El crecimiento comparable en el medio de la bacteria silvestre y la cepa mutante en la interacción planta-bacteria, la mutante las muestra una baja inhibición del crecimiento de la raíz primaria pero una gran formación de raíces laterales y pelos radiculares (datos no mostrados) comparado con la cepa silvestre. Interesantemente, la alteración de la arquitectura del sistema radicular se correlaciona con un incremento significativo en la producción de biomasa de follaje y raíz en plantas co-inoculadas con P. aeruginosa lasl (Figura 2). Estos descubrimientos sugieren que las señales de AHL producidas por las sintasa de AHL Lasi modula la producción de compuestos directamente involucrados en la producción de biomasa y procesos de división y diferenciación celular en la raíz.

10

15

EJEMPLO 2. P. aeruginosa produce ciclodipéptidos capaces/de estimutar desarrollo de raíces laterales en A. thaliana. Diversas especies bacteriarias poseen fa habilidad para producir auxinas. Para buscar si AIA o sustancias relacionadas al AIA son producidas por las cepas de P. aeruginosa probadas, se prepararon extractos de acetato de etilo de los sobrenadantes de cultivos de la cepa silvestre de P. aeruginosa y la mutante en la sintasa Lasl. Los extractos se fraccionaron mediante HPLC semi-preparativo (Figura 3) y los picos obtenidos se probaron por su habilidad de estimular la iniciación de raíces laterales mediante el conteo de primordios de raíces laterales (PRL). Se identificaron tres fracciones activas con un tiempo de retención de 7, 7.5 y 12 minutos, respectivamente (Figura 3, P6, P7 y P8). La adición de las fracciones purificadas por separado incrementa fuertemente la producción de PRL (datos no mostrados). Los correspondientes picos activos se acumulan en los extractos de la mutante sencilla *P. aeruginosa lasl* comparado con la cepa silvestre. La identidad molecular de los picos purificados 6, 7 y 8 fue resuelta mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, GC/MS (Figuras 4 y 5) y posteriormente confirmada por análisis del espectro de ¹H-NMR y ¹³C-NMR como los ciclodipéptidos, ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe), respectivamente (Figura 6).

10

15

20

en *Arabidopsis thaliana*. El crecimiento de raíces laterales y la formación de pelos radiculares están altamente regulados por las auxinas. El sistema heterocíclico peculiar de los ciclodipéptidos puede ser encontrado en el AIA y otros compuestos con actividad auxínica. El hallazgo de la co-inoculación de plantas de *A. thaliana* con

la mutante de *P. aeruginosa lasI* conduce a las plantas a un inclemento producción de biomasa y a una modificación de la arquitectura radicular (Figuras 1 y 2), lo cual propició a evaluar si los ciclodipéptidos encontrados actúan como mimetizadores de las señales auxínicas.

Para determinar si la producción incrementada de ciclodipéptidos por la mutante de P. aeruginosa las l puede afectar la señalización de las auxinas en las plantas, plantas transgénicas de A. thaliana que expresan el marcador inducible por auxinas DR5:uidA fueron co-inoculadas con P. aeruginosa WT o la mutante lasl. En las plantas transgénicas crecidas en condiciones control, el marcador DR5:uidA es expresado principalmente en la región de la punta de la raíz (Figura 7A). Las plantas DR5:uidA suplementadas con 3 µM de la auxina AlA muestran una fuerte actividad reportera de GUS a lo largo de toda la raíz primaria (Figura 7B), indicando que las respuestas a las auxina fueron activadas. El patrón de expresión de GUS en las plantas DR5:uidA co-inoculadas con P. aeruginosa es similar al observado en condiciones control (Figura 7C). En contraste, las plantas co-inoculadas con la mutante de P. aeruginosa lasl, se observa un claro incremento en la expresión de este marcador en toda la raíz primaria (Figura 7D), similar a lo que ocurre con las auxina AIA, indicando que el sistema de QS LasI regula la biosíntesis de compuestos con actividad auxínica.

10

15

Posteriormente, se evaluó la actividad de los tres ciclodipéptidos sobre la expresión de *DR5:uidA* en raíces mediante la transferencia de plantas de 6 días de edad crecidas en medios sólidos MS 0.2x a medios líquidos MS 0.2x suplementados con AlA (Figura 7E) o los ciclodipéptidos (Figura 7F), respectivamente. En la figura 7E y

7F se muestra la tinción histoquímica de plantas transgénicas VRS vida que fueron instituto mendano de la propiedad de la prop

EJEMPLO 4. Se evaluó el efecto de la aplicación del extracto que contiene los ciclodipéptidos procedentes de un cultivo de la bacteria de P. aeruginosa sobre el crecimiento vegetal de plántulas de Zea mays. A las plántulas de maíz les fue adicionado una cantidad de 0.1 a 1.0 µM (micromolar) de la mezcla de ciclodipéptidos, preferentemente 0.4 µM (Figura 8). Después de 10 días de crecimiento en medios Murashige and Skoog (MS) 0.2x, se observó un significante incremento en la producción de biomasa en follaje y raíz (Figura 8B) en las plántulas tratadas con la concentración indicada de la mezcla de ciclodipéptidos procedentes de P. aeruginosa. Estos incrementos en la biomasa se correlacionan con una alterada arquitectura del sistema radicular de Zea mays observada en las plántulas tratadas con la mezcla (Figura 8D) en comparación con las control sin tratamiento (Figura 8C). Estos descubrimientos sugieren que los efectos auxínicos y de modificación de arquitectura radicular, así como la promoción del crecimiento e incremento de biomasa provocados por los ciclodipéptidos de P. aeruginosa también son ejercidos sobre otros géneros de plantas, en este caso determinado en Zea mays.

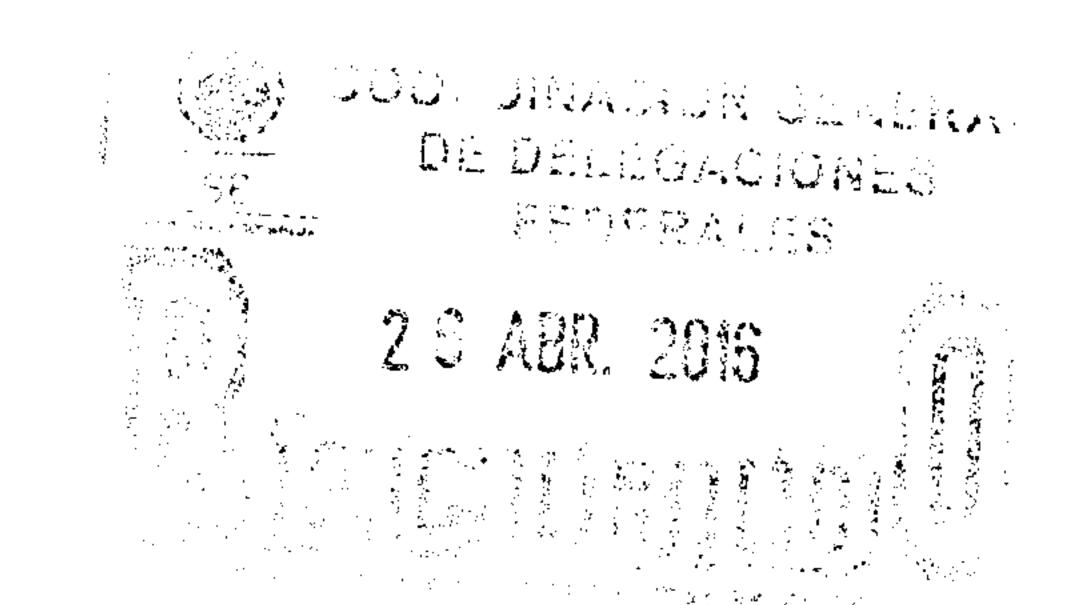
10

15

REIVINDICACIONES



- 1.- Una composición agrícola reguladora del crecimiento vegetal caracterizada porque comprende una mezcla de los ciclodipéptidos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe), que incrementa la biomasa en Maíz y Arabidopsis debido a su actividad auxínica.
- 2.- La composición de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizada además porque las concentraciones de la mezcla de los ciclodipéptidos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) que incrementan la biomasa en Arabidopsis son de 3 a 24 μM.
- 3.- La composición de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizada además porque las concentraciones de la mezcla de los ciclodipéptidos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) que incrementan la biomasa en Maíz son de 0.1 a 1 μM.

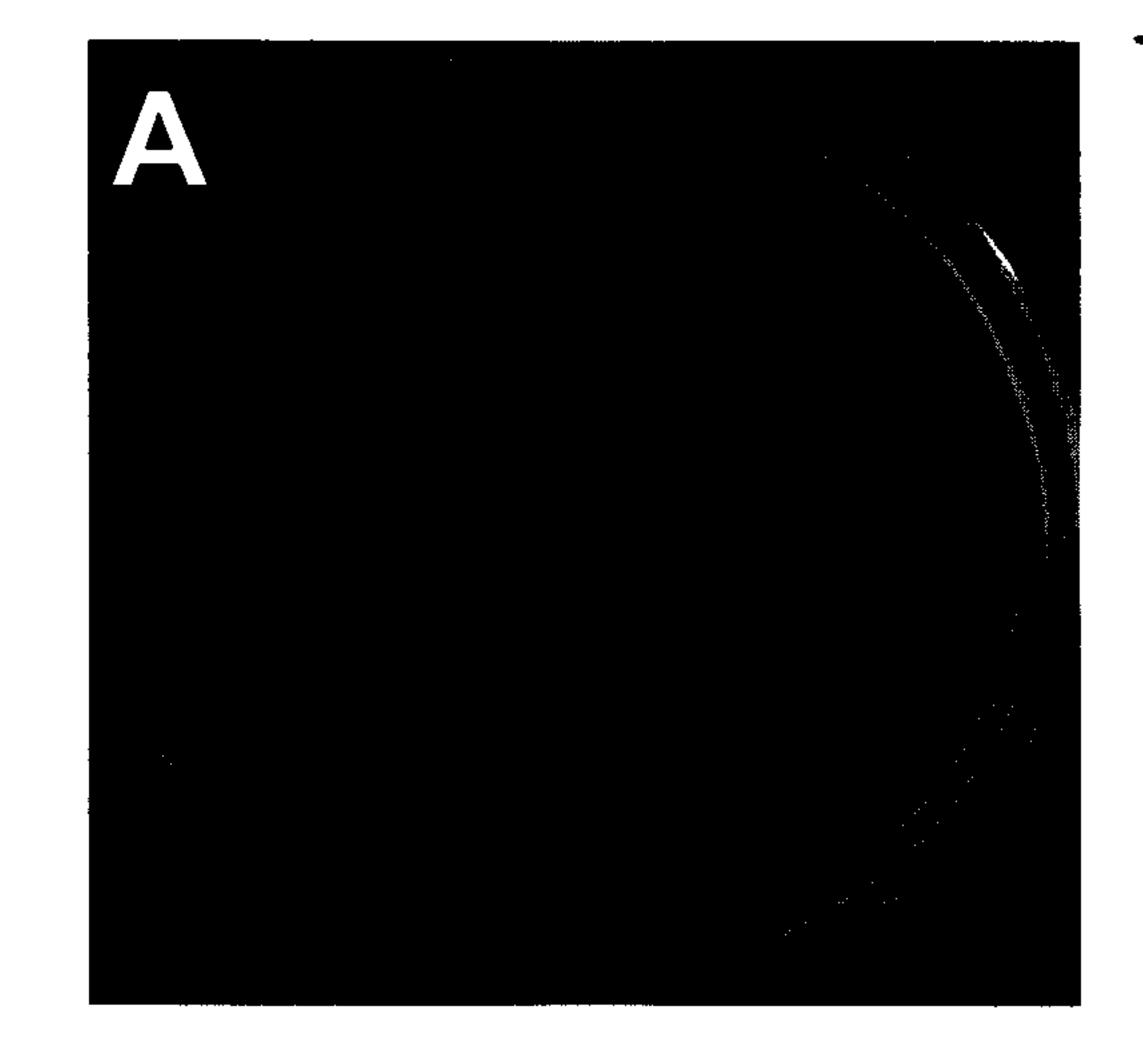


RESUMEN

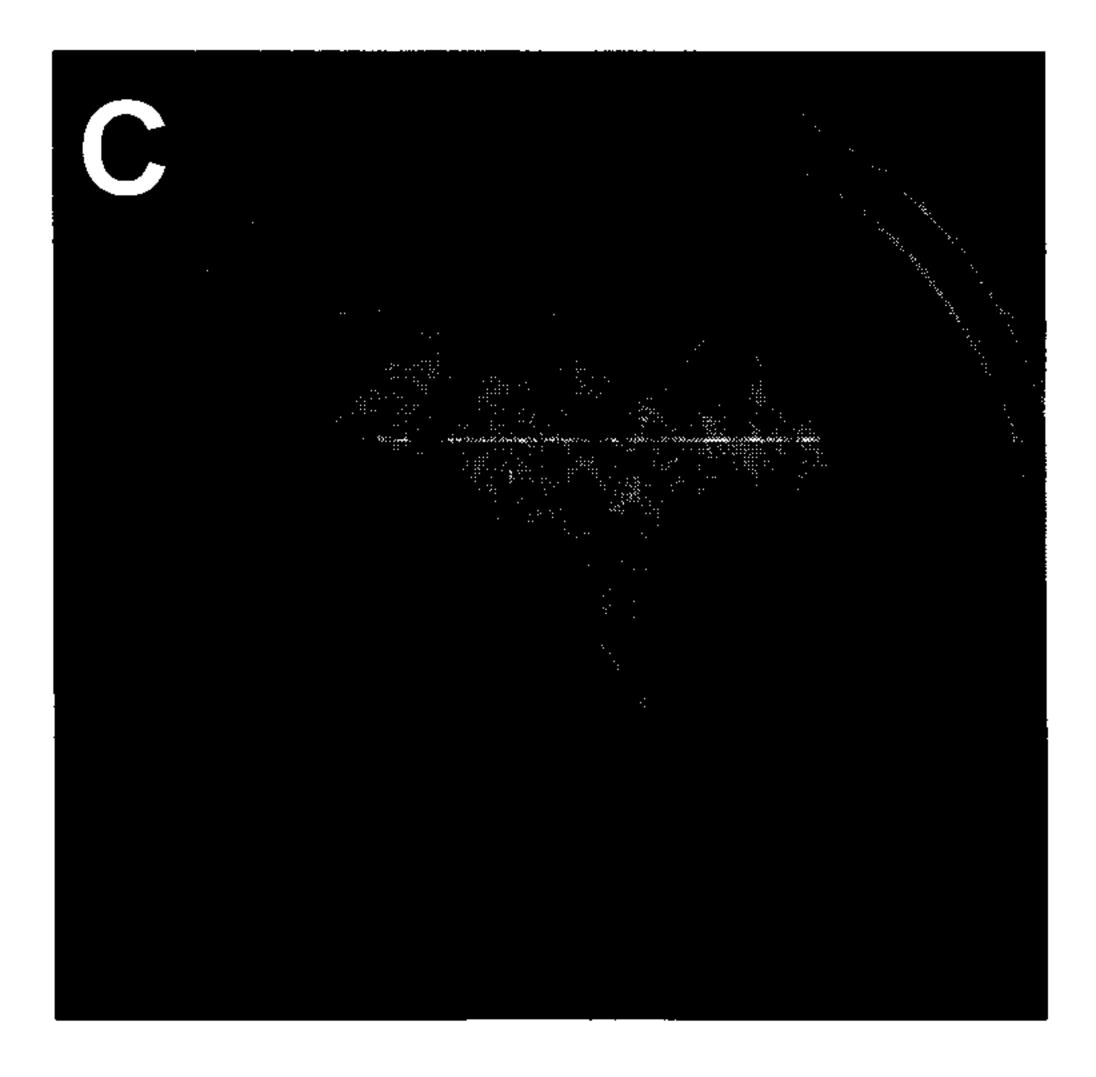


La presente invención se refiere a compuestos con actividad auxínica capaces de regular el crecimiento vegetal induciendo el incremento en biomasa tanto del sistema radicular como del follaje. Los compuestos de la presente invención son ciclodipéptidos, también conocidos como dipéptidos cíclicos o dicetopiperazinas. En particular la presente invención se refiere a una composición agrícola que contiene una cantidad efectiva capaz de incrementar la biomasa de las plantas, cuyo contenido activo es constituido por los ciclodipéptidos procedentes de la bacteria correspondiente a la especie de *P. aeruginosa* denominados como ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val), o ciclo(L-Pro-L-Phe).





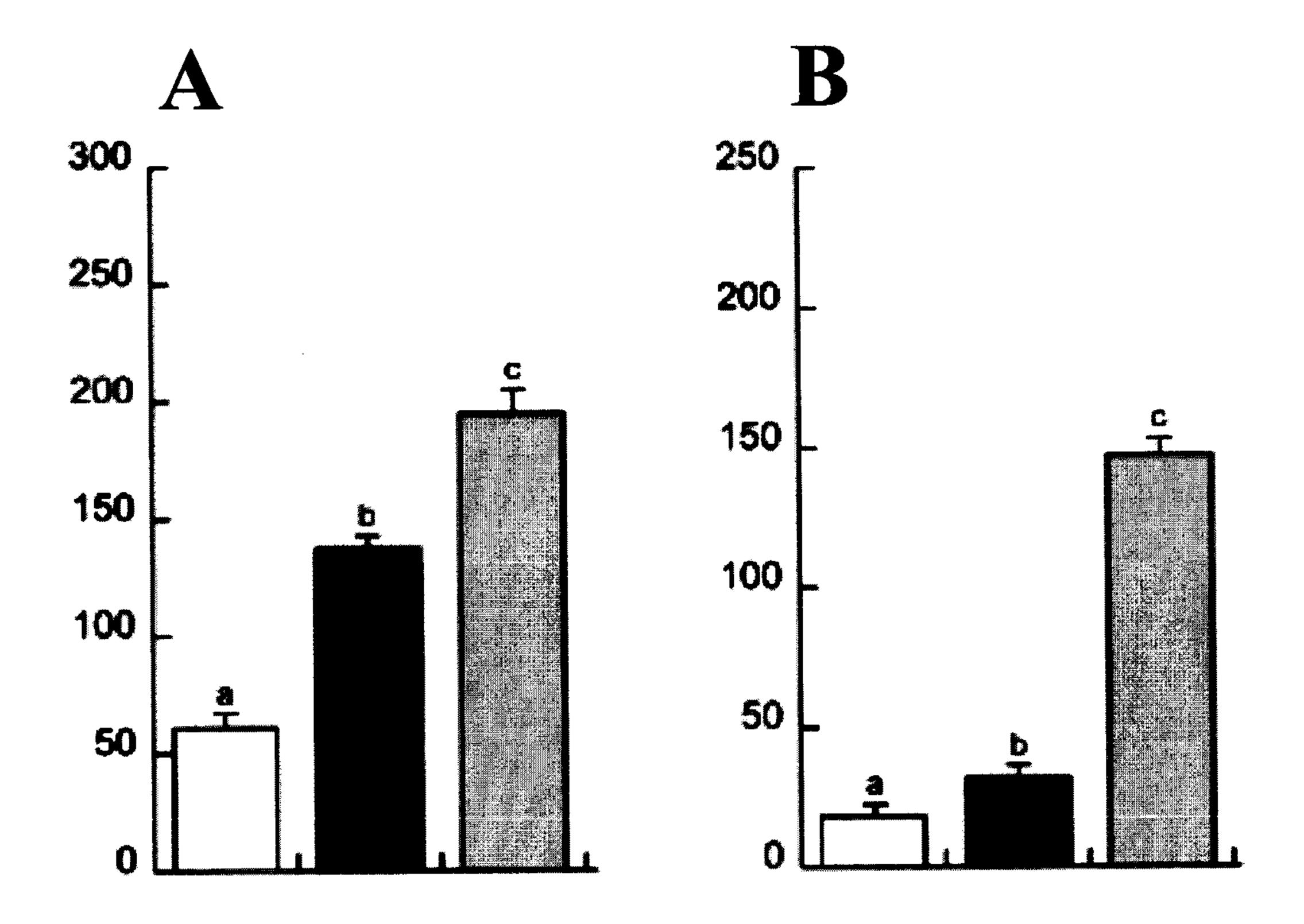




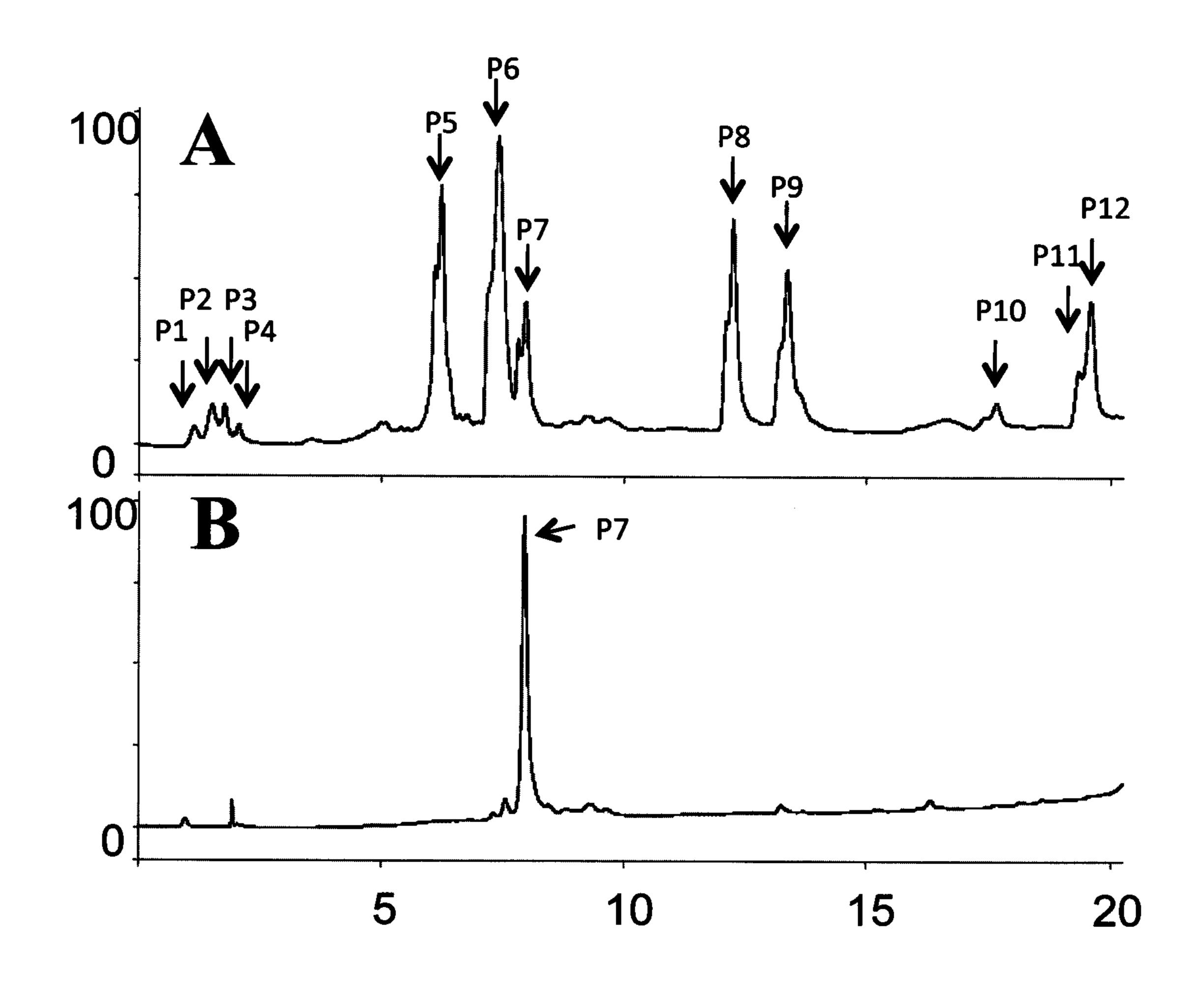
.



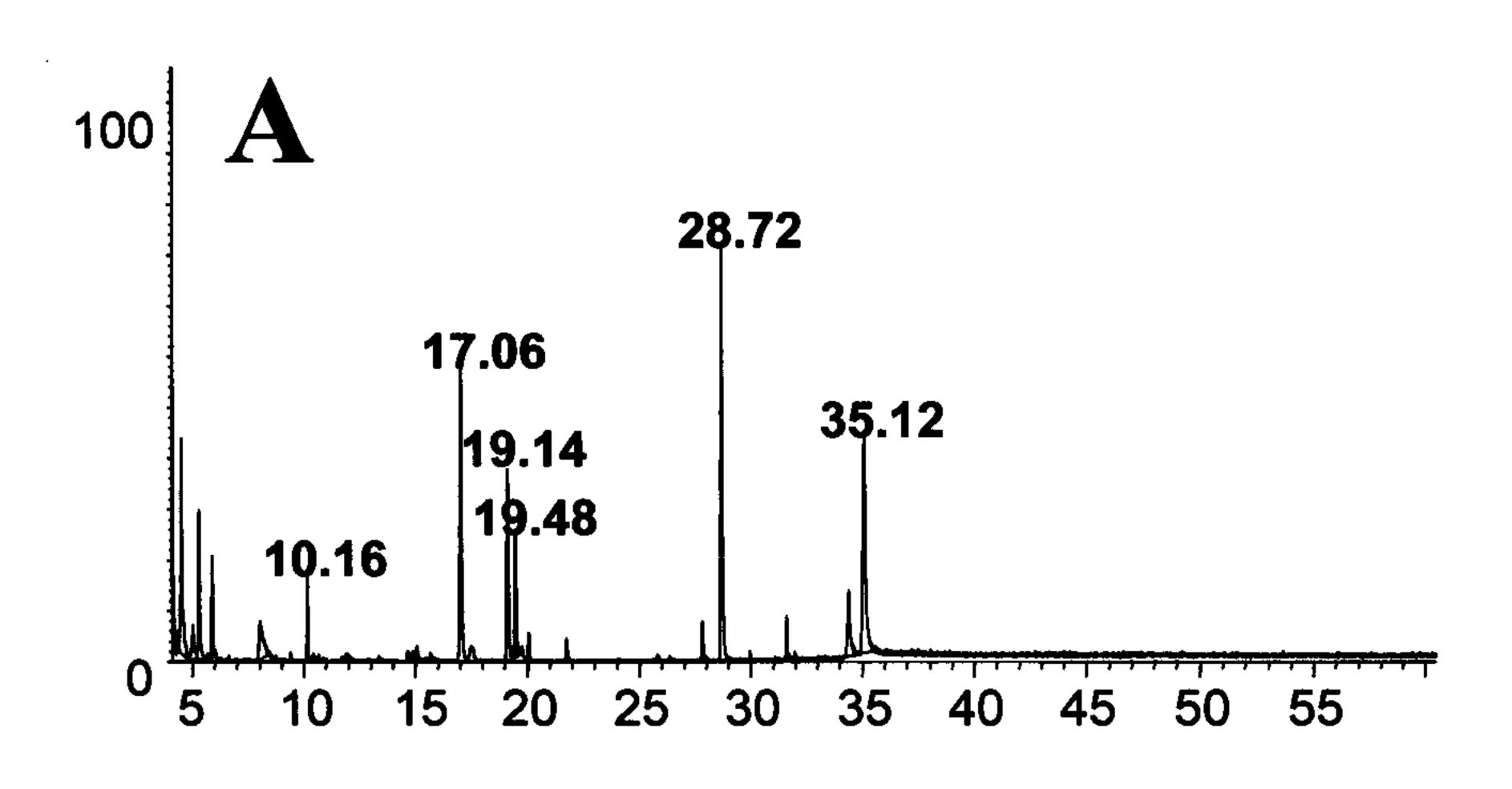
Figura 2

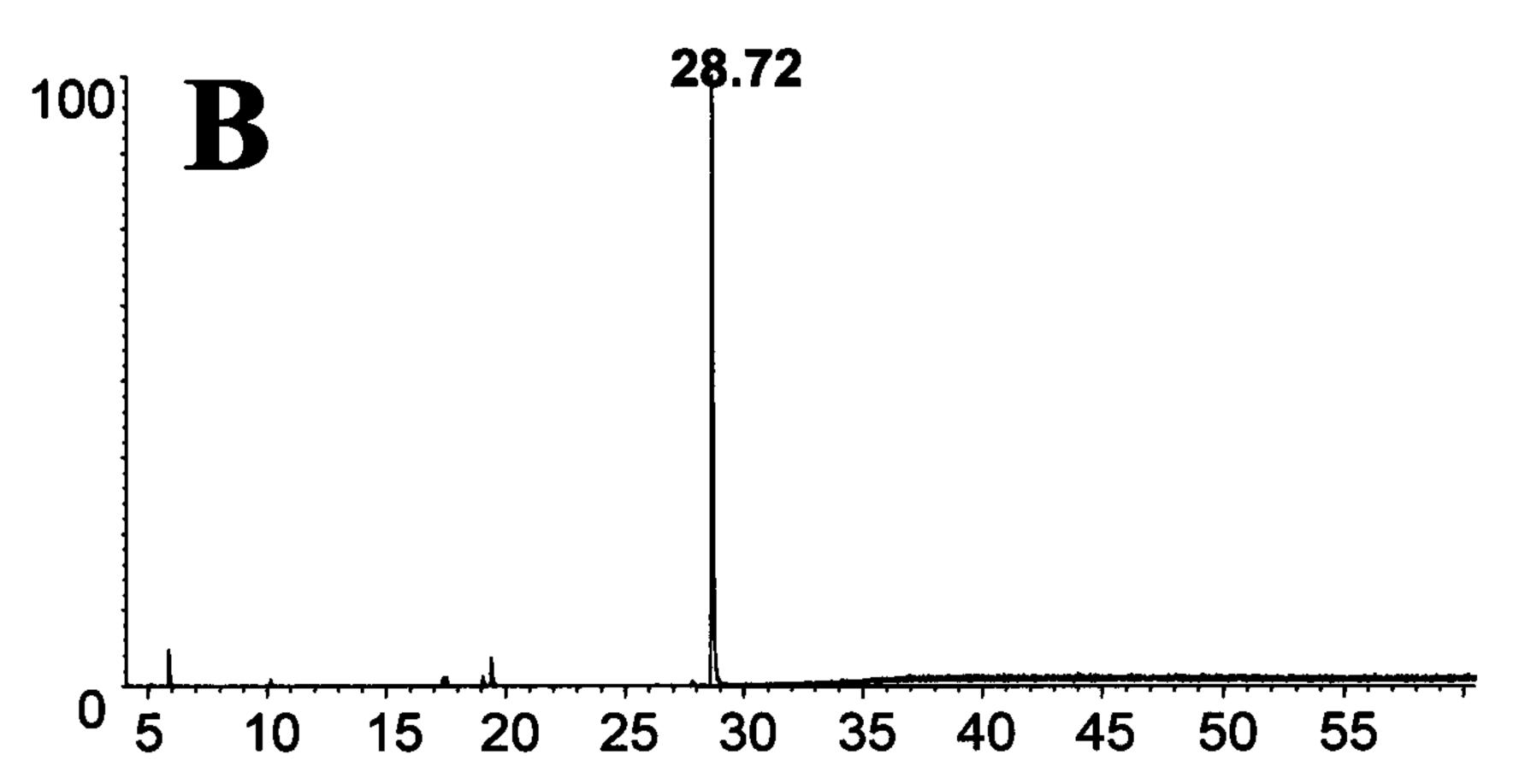


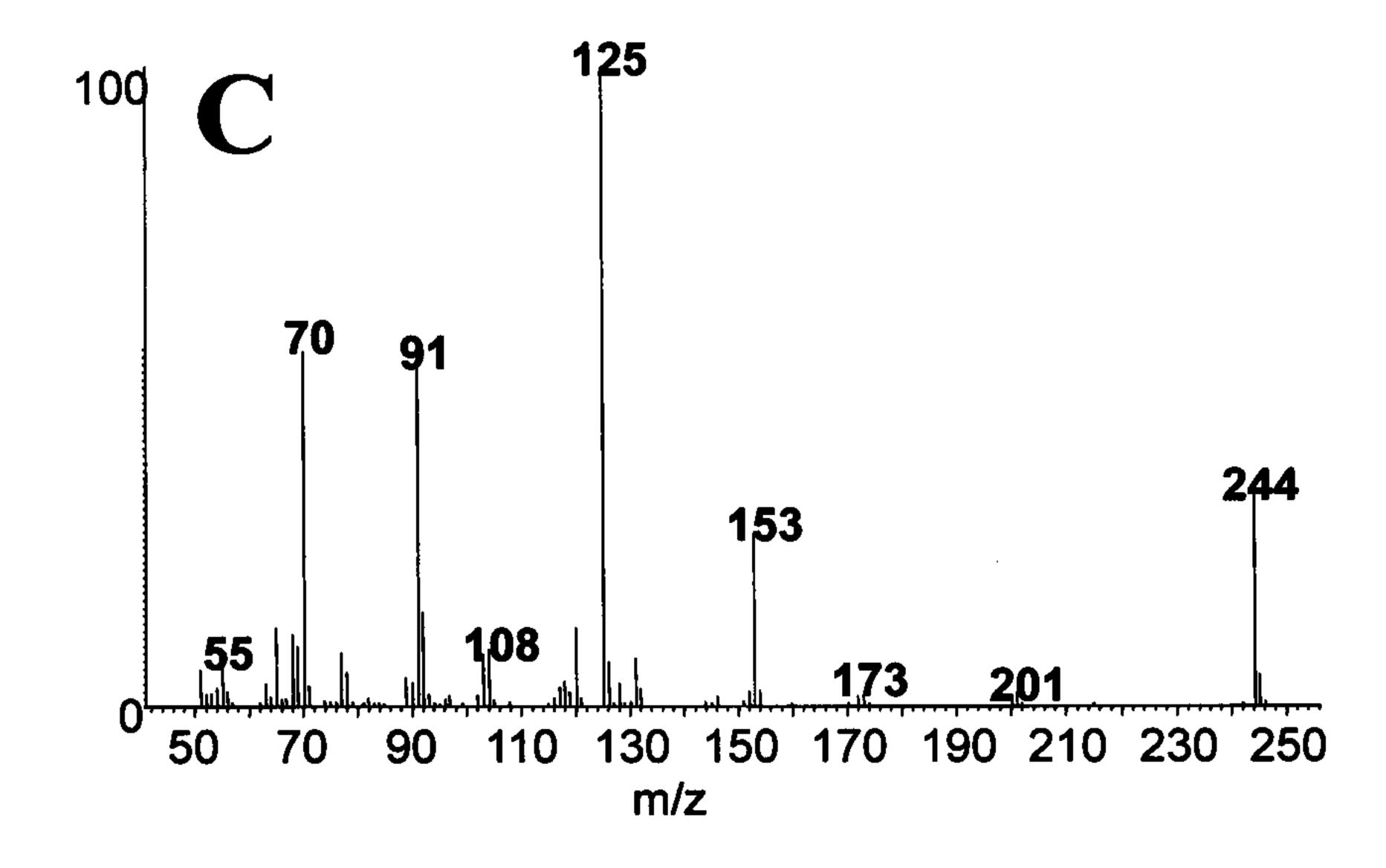




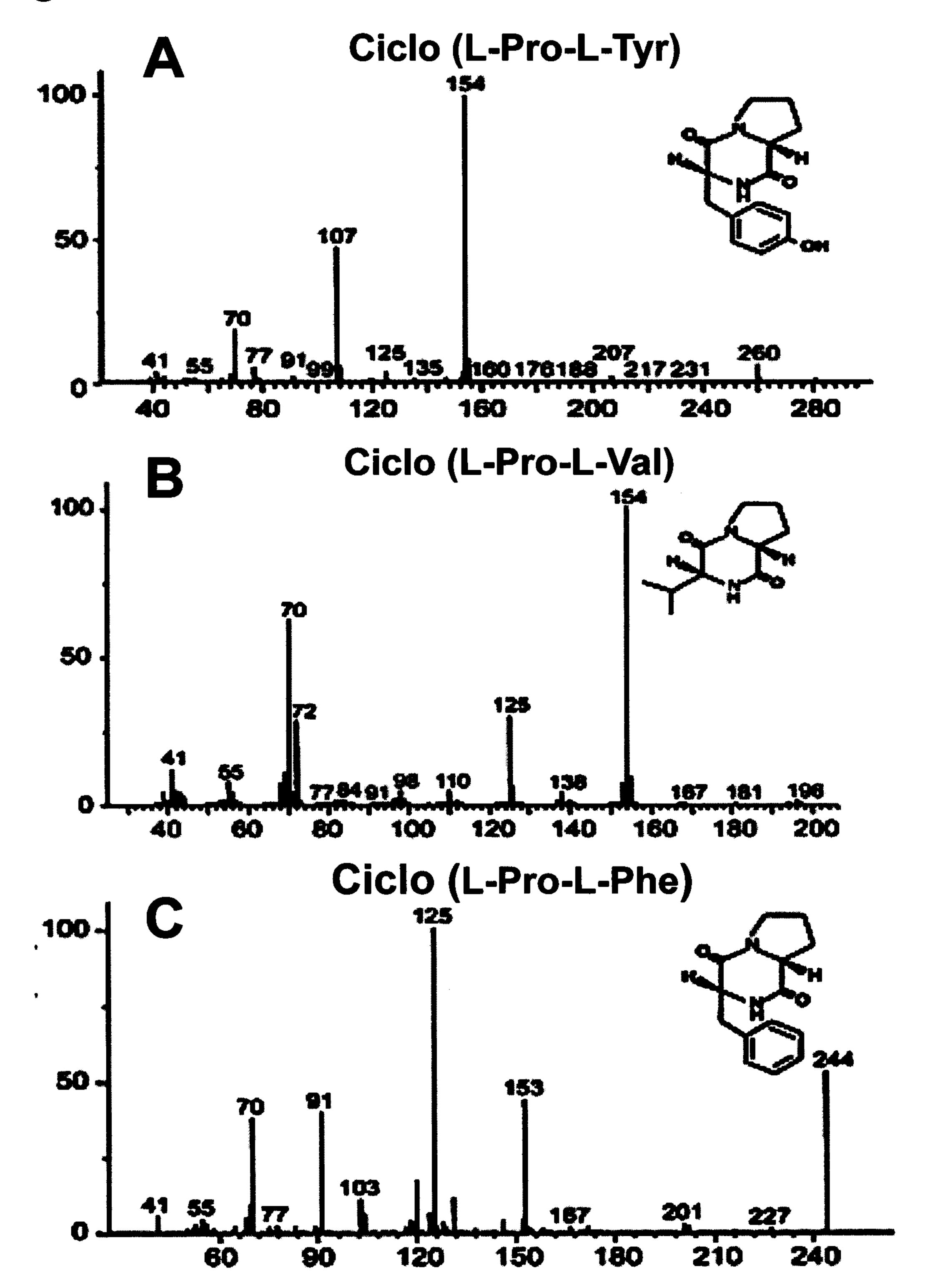














Ciclo (L-Pro-L-Tyr)

Ciclo (L-Pro-L-Val)

C

Ciclo (L-Pro-L-Phe)



