

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 643**

21 Número de solicitud: 202030476

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

22.05.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.11.2021

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

22.05.2023

Fecha de concesión:

12.06.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

19.06.2023

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT JAUME I (100.0%)
AVDA. DE VICENT SOS BAYNAT, S/N
12071 CASTELLÓN DE LA PLANA (Castellón) ES**

72 Inventor/es:

**SCALSCHI, Loredana Maria;
VICEDO JOVER, Begonya;
LLORENS VILARROCHA, Eugenio;
GARCÍA AGUSTÍN, Pilar;
FARVARDIN, Atefeh;
CAMAÑES QUEROL, Gemma;
GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, Ana Isabel y
FALOMIR VENTURA, Eva**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Proteínas y péptidos antimicrobianos con actividad inductora de resistencia frente a estrés**

57 Resumen:

La presente invención está relacionada con proteínas y péptidos con actividad inductora de resistencia frente a estrés, particularmente frente a microorganismos, así como actividad biocida, bioestática y/o permite el control del crecimiento de microorganismos. La presente invención también comprende composiciones que comprenden dichas proteínas y el uso de estas como productos fitosanitarios, así como el uso de estas en un método para incrementar la resistencia de una planta frente a por lo menos un microorganismo.

ES 2 879 643 B2

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas y péptidos antimicrobianos con actividad inductora de resistencia frente a estrés

5

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con Proteínas y péptidos antimicrobianos con actividad inductora de resistencia frente a microorganismos en plantas, composiciones
10 que los comprenden, así como el uso de estos como productos fitosanitarios frente a microorganismos. La presente invención también comprende un método para incrementar la resistencia de una planta frente a por lo menos un microorganismo patógeno.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La interacción planta patógeno está en el punto de mira de numerosas investigaciones durante las últimas décadas. El control de las plagas y/o patógenos que atacan o dañan los cultivos es primordial para satisfacer las necesidades alimentarias de una población
20 mundial en constante aumento. Los diferentes métodos utilizados hasta la fecha en el control de plagas se basan principalmente en la utilización de productos químicos que a menudo son perjudiciales para el medio ambiente, los animales o los insectos, e incluso para la salud humana. Sin embargo, en los últimos años, se han descubierto nuevos métodos de control de patógenos basados en la resistencia innata de las
25 plantas, así como algunos compuestos que son capaces de estimular dicha resistencia frente a patógenos de forma natural.

La estimulación de dichas respuestas defensivas es actualmente, uno de los mecanismos en desarrollo para la protección de cultivos. Se ha demostrado que la
30 aplicación de ciertos compuestos naturales es capaz de estimular las defensas naturales de las plantas, afectando su resistencia al ataque de algunos patógenos. Una desventaja asociada a estos métodos es que a menudo pueden producir un impacto negativo en el crecimiento de la planta. Uno de los compuestos más utilizados en investigación es el ácido dL-β aminobutírico (BABA), que, pese a ser un compuesto que
35 se ha detectado en las plantas, se ha desaconsejado su uso a nivel agronómico debido a que, en aplicación exógena, puede ser tóxico para éstas.

- Por ello, se ha postulado que la optimización artificial de las proteínas antimicrobianas de las plantas pronto representará una estrategia rápida y rentable para desarrollar nuevos pesticidas naturales diseñados para combatir plagas y patógenos de relevancia agronómica. En esta área, se identifican varias divulgaciones. El artículo de Bengtsson
- 5 T. et al. tiene por objeto un estudio proteómico del apoplasto de las hojas de la patata llevado a cabo después del tratamiento de la planta con BABA. Bengtsson T. et al, (BMC Genomícs, 2014 15:315) divulga que dentro del grupo de proteínas cuya expresión experimenta un aumento en plantas tratadas, se encuentra la proteína antifúngica CBP20, o la Sn-1, una proteína del tipo Snakin, siendo este tipo de proteínas conocido
- 10 por su papel antimicrobiano en la defensa de las plantas. El tratamiento que se realiza en la planta se lleva a cabo contra *Phytophthora* en el mismo lugar en el que se inocula el patógeno. Sin embargo, no se lleva a cabo ningún estudio sobre el efecto que puede tener el BABA ni la proteína por sí mismos contra el patógeno.
- 15 El documento de Scalschi L et al. (Frontiers in microbiology, Aug 2019, 9:2056), divulga un análisis de las modificaciones, a nivel transcriptómico y metabolómico, de la composición del apoplasto de las hojas de la planta del tomate inducidas por el tratamiento, por aplicación -por riego, del compuesto 1-metil-triptófano, el cual confiere resistencia a la planta frente al ataque del patógeno *Pseudomonas syringae*. El estudio
- 20 comprende, entre otros aspectos, el análisis de la expresión de genes implicados en las rutas de defensa y cómo se incrementa la expresión de los genes que codifican ciertas proteínas, como ASR1 o PR-5, si bien este último trabajo hace referencia puntual solo a algunas proteínas y a nivel transcriptómico, pero no incluye un verdadero análisis proteómico.
- 25 El líquido apoplástico se compone sobre todo de iones inorgánicos, metabolitos y proteínas y su contenido depende de muchos factores tales como, el estado de la planta, su nutrición o la respuesta contra el estrés biótico o abiótico al que esté sometida. Teniendo en cuenta que hay tantos factores que condicionan el contenido del apoplasto,
- 30 se concluye que la efectividad del tratamiento con 1-metil-triptófano frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* puede ser causado en parte por la inhibición de la apertura estomatosa, regulada por la toxina bacteriana coronatina COR, ya que las plantas tratadas presentan niveles de ABA más altos y estomas más cerrados, lo que podría bloquear o prevenir la entrada de bacterias. Los niveles de 1-metil-triptófano no

parecieron tener ningún efecto antimicrobiano en la planta, resultados que fueron confirmados *in vitro*.

Las enfermedades provocadas por estos microorganismos, por ejemplo, en plantas de
 5 interés agrícola u ornamental, requieren el uso de una alta cantidad de biocidas para
 prevenir o tratar dichas enfermedades provocando daños medioambientales. La falta de
 eficacia en algunos de estos productos conduce a la vez a cuantiosas pérdidas en el
 sector, lo que lleva en ocasiones al desabastecimiento e incrementos de precios. La
 aparición en los microorganismos de resistencias frente a los productos utilizados obliga
 10 al uso de concentraciones mayores o a la desestimación de estas moléculas. En algunos
 países todavía en vías de desarrollo o con rentas económicas bajas, el uso de estos
 compuestos a altas concentraciones podría afectar gravemente a la salud, al bienestar
 de la población y al medio ambiente.

15 Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un producto para el tratamiento de
 enfermedades causadas por microorganismos y parásitos en seres vivos,
 concretamente en plantas, que favorezca la resistencia de las plantas frente a los
 mismos. Así como el desarrollo de métodos para incrementar la resistencia de una
 planta frente a al menos un microorganismo patógeno a través de procesos respetuosos
 20 con el medioambiente que se puedan aplicar a nivel industrial.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La solución planteada por la presente invención al problema técnico anteriormente
 25 expuesto es la recogida en las reivindicaciones 1 a 15.

El primer aspecto de la presente invención está relacionado con el uso de una proteína
 aislada que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 o una
 secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2, o de un péptido
 30 obtenido a partir de dicha proteína, para inducir resistencia frente a microorganismos en
 plantas y/o como biocida frente a microorganismos patógenos de plantas, donde la
 secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 y el péptido obtenido
 a partir de dicha proteína mantienen la función de la proteína que comprende la SEQ ID
 NO: 2 y donde los microorganismos se seleccionan de una lista que consiste en virus,
 35 bacterias y hongos patógenos de plantas.

La proteína aislada presenta una actividad inductora de resistencia frente a microorganismos, de manera particular presenta actividad biocida, bioestática y/o permite el control del crecimiento de microorganismos patógenos.

5

Otro aspecto de la presente descripción está relacionado con un ácido nucleico aislado que codifica la proteína según la proteína del primer aspecto.

Otro aspecto de la presente descripción está relacionado con un vector que comprende un ácido nucleico según lo anterior.

10

Otro aspecto de la presente descripción está relacionado con una célula hospedadora que comprende la proteína del primer aspecto y/o un ácido nucleico y/o un vector según lo anterior.

15

Otro aspecto de la presente descripción está relacionado con una planta transgénica que comprende una proteína según el primer aspecto, o un ácido nucleico o un vector o una célula hospedadora según lo anterior.

Otro aspecto de la presente descripción está relacionado con un proceso de obtención de la proteína del primer aspecto que comprende las siguientes etapas:

- i) Proporcionar una planta para su posterior tratamiento;
- ii) Tratar la planta de la etapa i) con 1-metil-triptófano y un vehículo durante al menos 24 horas;
- 25 iii) Extraer la proteína del primer aspecto del apoplasto de la planta tratada;
- iv) opcionalmente, purificar la proteína de la etapa iii).

Otros aspectos de la presente invención están relacionados con el uso de la proteína o de un péptido obtenido a partir de la misma, según el primer aspecto, como fitosanitarios frente a microorganismos, o para el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por microorganismos en plantas.

30

Otro aspecto de la presente descripción está relacionado con la proteína según el primer aspecto para su uso como inductora de resistencia frente al estrés en plantas.

35 Preferiblemente, para su uso como inductora de resistencia frente a microorganismos.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con una composición que comprende la proteína o el péptido obtenido a partir de dicha proteína, según el primer aspecto, y un excipiente químicamente aceptable.

5

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con el uso de la composición anterior como fitosanitario frente a microorganismos.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con el uso de la composición anterior para el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por microorganismos en plantas.

Otro aspecto de la invención está relacionado con un método para incrementar la resistencia de una planta frente a por lo menos un microorganismo patógeno, que comprende por lo menos las etapas:

15

a) aplicar una composición a una planta o a una parte de una planta, donde dicha composición comprende por lo menos la proteína o el péptido obtenido a partir de dicha proteína según el primer aspecto de la invención, y un vehículo,

b) donde la proteína o el péptido de la etapa a) tienen un efecto en la planta de manera que producen un incremento en la resistencia a, al menos, un microorganismo en la planta, comparada con la resistencia a ese microorganismo en la planta en la ausencia de la aplicación de dicha composición;

c) opcionalmente, monitorizar del crecimiento del microorganismo en la planta tratada, frente a una planta sin tratar.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El primer aspecto de la presente invención está relacionado con el uso de una proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO:2 o una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2, o de un péptido obtenido a partir de dicha proteína, para inducir resistencia frente a microorganismos en plantas y/o como biocida frente a microorganismos patógenos de plantas, donde la secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 y el péptido obtenido

35

a partir de dicha proteína mantienen la función de la proteína que comprende la SEQ ID NO: 2 y donde los microorganismos se seleccionan de una lista que consiste en virus, bacterias y hongos patógenos de plantas.

5 En la presente invención, la SEQ ID NO: 2 se refiere a la proteína Heme-binding2.

En la presente invención los términos "identidad de secuencia", "identidad", "similitud" e "idéntico", se consideran equivalentes y se pueden usar indistintamente. Se entiende que el término "identidad de secuencia" significa el grado de similitud entre dos
10 secuencias de aminoácidos obtenidas alineando las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado diferente de identidad, expresado como un porcentaje. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos de alineación de secuencia estándar conocidos en el
15 estado de la técnica, tales como, por ejemplo, BLAST [Aitschul S.F. et al. Herramienta básica de búsqueda de alineación local. J Mol Biol. 5 de octubre de 1990; 215 (3): 403-10]. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN, son de dominio público en el sitio web del Centro Nacional de Información de Biología (NCBI). Las proteínas con la identidad de secuencia mencionada
20 anteriormente para la SEQ ID NO: 2 se consideran variantes de la SEQ ID NO: 2 y también se contemplan dentro de la presente invención. Concretamente una secuencia con al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 2. Se contempla también dentro la presente invención aquella secuencia análoga, derivada o equivalente a la SEQ ID NO: 2, y que comprende al menos un residuo de aminoácido
25 alterado por una sustitución, adición, delección o modificación química de un aminoácido, en comparación con la proteína de la presente invención.

En el contexto de esta descripción, se entiende por actividad inductora de la resistencia frente al estrés en plantas al proceso mediante el cual, a través de un tratamiento, se
30 inducen las respuestas defensivas de la planta frente a un estrés.

En el contexto de esta descripción, se entiende por estrés a las alteraciones que se producen en la planta como respuesta ante determinados factores biológicos, físicos, químicos y/o ambientales.

35

El estrés puede ser biótico o abiótico. Se entiende por estrés biótico al efecto causado sobre la planta por otros seres vivos, animales, plantas, microorganismos, insectos o nemátodos.

- 5 En el contexto de esta invención el termino microorganismos se refiere a organismos microscópicos concretamente a protozoos, bacterias, virus, priones y hongos.

En el contexto de la presente descripción el termino estrés abiótico se refiere al efecto causado por cualquier factor ambiental, físico o químico, como temperaturas extremas, exceso o deficiencia agua u oxígeno, el tipo de suelo y su pH, la deficiencia de
10 nutrientes, exceso de metales pesados, exceso de sales o por la contaminación del aire que actúe sobre la planta, afectando a la respuesta bioquímica y fisiológica de la misma, pudiendo provocar daños, enfermedades o lesiones.

- 15 En una realización preferida, la proteína del primer aspecto comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 o una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2, o un péptido obtenido a partir de la misma, donde dicha proteína o dicho péptido es capaz de inducir resistencia frente a microorganismos en plantas y/o de actuar como biocida frente a microorganismos patógenos de plantas. Más
20 preferiblemente, la proteína del primer aspecto comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% identidad con la SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente con al menos un 80 %, incluso más, preferiblemente con al menos un 85 %.

En una realización preferida, la proteína aislada del primer aspecto de la invención o el
25 péptido obtenido a partir de dicha proteína, presentan actividad biocida, bioestática y/o actividad inductora de resistencia frente a microorganismos patógenos de plantas.

En el contexto de esta invención, se entiende por actividad biocida, a la actividad que tiene por objeto matar o detener el desarrollo de organismos vivos o impedir la acción
30 de estos.

En el contexto de esta invención, se entiende por actividad biostática la capacidad de una sustancia de detener el crecimiento de los microorganismos y/o inhibir su capacidad de reproducción. Preferiblemente, frente a microorganismos seleccionados de una lista
35 que consiste en virus, bacterias y hongos patógenos de plantas. En una realización más

preferida la proteína aislada del primer aspecto presenta actividad biocida, bioestática y/o actividad inductora de resistencia frente microorganismos patógenos de plantas, donde el microorganismo es al menos una bacteria que se selecciona de una lista de géneros que consiste en: *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Ralstonia*, *Clavibacter*,
 5 *Erwinia*, *Xylella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Klepsiella*, *Serratia*, *Micrococcus* y/o los hongos que se seleccionan de una lista de géneros que consiste en, *Botrytis*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Streptomyces* y *Apergillus*. En una realización más preferida la proteína aislada del primer aspecto presenta actividad biocida, bioestática y/o actividad inductora de resistencia frente microorganismos patógenos de plantas, donde el microorganismo
 10 es por lo menos una bacteria que se selecciona de una lista que consiste en, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp*, *Klepsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* y/o el hongo se selecciona de una lista que consiste
 15 en, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

La proteína aislada del primer aspecto se obtiene del apoplasto de plantas sometidas previamente a un tratamiento con 1-metil-triptófano. Preferiblemente, es obtenida mediante extracción directa del apoplasto de plantas sometidas previamente a un
 20 tratamiento con 1-metil triptófano o mediante clonación o síntesis química. En una realización particular, las plantas son de la familia de las solanáceas. Estas, pueden ser plantas solanáceas de interés agrícola u ornamental.

El apoplasto se define como la matriz extracelular, incluyendo la pared celular y los
 25 espacios intercelulares que contiene el líquido apoplástico. Por el líquido apoplástico fluye agua y otras sustancias como dióxido de carbono, sales minerales, nutrientes y moléculas secretadas por las células vegetales.

Otro aspecto de la presente descripción está relacionado con un ácido nucleico aislado
 30 que codifica la proteína según la proteína del primer aspecto. Particularmente, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia nucleotídica según la SEQ ID NO: 4.

Otro aspecto de la presente descripción está relacionado con un vector que comprende dicho ácido nucleico.

35

En la presente descripción el término "vector" se refiere a una molécula de DNA linear o circular que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de la presente invención y que, está unido operativamente a nucleótidos adicionales (secuencias control) que proporcionan su expresión.

5

En la presente descripción el término "unido operativamente" se refiere a una disposición de dos o más componentes, en donde dichos componentes están en una relación que les permite funcionar de manera coordinada.

10 Otro aspecto de la presente descripción está relacionado con una célula hospedadora que comprende la proteína del primer aspecto o un ácido nucleico o un vector como se ha descrito anteriormente.

15 En la presente invención, el término "célula hospedadora" se refiere a cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción o conjugación con el ácido nucleico aquí descrito o con el vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico.

20 En la presente invención por "péptido" se entienden polipéptidos consistentes en 10-100 residuos de aminoácidos de la proteína de la presente invención, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 15 a 30 residuos de aminoácidos, en donde el grupo amino de un residuo de aminoácido está unido al grupo carboxilo de otro residuo de aminoácido por un enlace peptídico. Un péptido puede ser un péptido natural o un
25 péptido diseñado y producido sintéticamente. El péptido de la presente invención puede obtenerse, por ejemplo, a partir de la proteína de la presente invención mediante escisión enzimática o química, o puede prepararse usando técnicas convencionales de síntesis de péptidos (por ejemplo, síntesis en fase sólida) o técnicas de biología molecular (véase Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold
30 Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)).

Otro aspecto de la presente descripción está relacionado con una planta transgénica que comprende una proteína según el primer aspecto, y/o un ácido nucleico y/o un vector y/o una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente.

35

En una realización preferida, la planta transgénica es resistente a microorganismos patógenos de plantas. Preferiblemente, la planta transgénica se selecciona de la familia de solanáceas. Las plantas solanáceas pueden ser tanto de interés ornamental como de interés agrícola. Más preferiblemente, la planta se selecciona de una lista que
5 consiste en tomate, berenjena, pimiento, patata, maíz, Petunia, Schizanthus, Salpiglossis y Datura.

Otro aspecto de la presente descripción está relacionado con un proceso de obtención de la proteína del primer aspecto que comprende por lo menos las siguientes etapas:
10 i) Proporcionar una planta para su posterior tratamiento;
ii) Tratar la planta de la etapa i) con una mezcla de 1-metil-triptófano y un vehículo durante por lo menos 24 horas;
iii) Extraer del apoplasto de la planta tratada la proteína del primer aspecto;
iv) opcionalmente, purificar la proteína de la etapa iii).

15 En una realización particular del proceso, la planta de la etapa i) se puede obtener por siembra de semilla o por estaquilla.

En una realización preferida del proceso, el tratamiento de la etapa ii) se lleva a cabo
20 via radicular o vía aérea. Más preferiblemente, el tratamiento de la planta en la etapa ii) se realiza por medio de un método de riego por goteo o pulverización.

En una realización preferida del proceso, la planta se trata con 1-metiltriptófano durante por lo menos 24 horas hasta 96 horas. Más preferiblemente, durante por lo menos 24
25 horas hasta 65 horas. Tiempos inferiores no permiten obtener una respuesta eficaz para la planta. Con este rango de tiempo se previene y/o se reduce la formación de impurezas y productos de degradación no deseados y se optimiza la obtención de la proteína de acuerdo al primer aspecto de la invención, permitiendo la absorción del 1-metil-triptófano en su totalidad por la planta.

30 En una realización preferida del proceso, la mezcla de la etapa ii) comprende una mezcla de 1-metil-triptófano y un vehículo, y donde la mezcla tiene un pH en un rango entre 4,5-8. El vehículo puede ser una solución nutritiva o una disolución acuosa con un pH en un rango entre 4,5-8. Preferiblemente, el pH de la disolución acuosa y de la
35 mezcla de la etapa ii) es entre 5 hasta 6,5. En el contexto de la presente descripción, se

entiende como disolución nutritiva a la solución de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950), solución nutritiva desarrollada para el cultivo de plantas sin suelo o sustrato, para cultivo hidropónico, que proporciona todos los nutrientes esenciales para el desarrollo de la planta, disolviendo las sales fertilizantes en agua para preparar la solución de nutrientes.

5 La solución de Hoagland comprende entre otros componentes, Na, K, quelatos de hierro, tales como Fe EDTA (etilendinitrilo tetraacetato ferrato) para mejorar la estabilidad de las plantas, fue definida por Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. 1950- en The water-culture method for growing plants without soil. California. Agricultural Experiment Station. Circular 347. 32 p.

10

En una realización preferida del proceso, la mezcla de 1-metil-triptófano (1-MT) y vehículo es una disolución acuosa, preferiblemente, en la etapa ii) se trata la planta de la etapa i) con entre 5-100 mL de una disolución acuosa de 1-metil-triptófano con una molaridad en un rango entre 0,1 micro molar hasta 20 mM. La molaridad de 1-MT ayuda a optimizar el rendimiento en la obtención de la proteína según el primer aspecto de la invención.

15

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con el uso de la proteína o de un péptido obtenido a partir de dicha proteína, según el primer aspecto, como fitosanitarios frente a microorganismos. Más preferiblemente, para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por microorganismos en plantas.

20

En una realización preferida, el microorganismo es una bacteria que se selecciona de una lista que consiste en *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* y/o un hongo que se selecciona de una lista que consiste en, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

25

30

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con una composición que comprende con la proteína o un péptido obtenido a partir de dicha proteína, según el primer aspecto, y un excipiente químicamente aceptable.

35

En la presente invención por "excipiente" se refiere a cualquier componente que no tiene

actividad terapéutica y que es no tóxico, principalmente se refiere a vehículos y tampones tales como soluciones salinas, soluciones acuosas, emulsiones, diluyente, un aglutinante, disgregante, coadyuvante y/o lubricante.

- 5 En una realización preferida, la composición de la invención comprende un excipiente que puede ser un diluyente, un aglutinante, disgregante y/o lubricante.

En una realización preferida, la composición de la invención presenta una forma sólida, semisólida, líquida, gel, aerosol o en forma de micropartículas. Opcionalmente, la
10 composición puede estar recubierta. Las micropartículas, poseen un tamaño de partícula medio, D50, entre 50 hasta 500 micras (en volumen)

El término "Dx" en el contexto de la invención significa que x % de las partículas de la sustancia o composición (basado en volumen) tienen un diámetro igual o inferior a un
15 valor especificado por Dx. Por lo tanto, un D50 de 50 micras significa que el 50% de las partículas, medido en volumen, tienen un diámetro igual o inferior a 50 µm. Del mismo modo que se usa D50 como medida para determinar el tamaño de partícula, D90 también se puede usar para este propósito. Por lo tanto, D90, significa que el 90% de la población de partículas (basado en volumen) tiene un diámetro igual o inferior al valor
20 de D90, establecido. El tamaño de partícula se puede medir a través de varios métodos convencionales incluyendo microscopía electrónica utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM).

En una realización preferida, la composición de la invención, es adecuada para su uso
25 agrícola o como fitosanitario frente a microorganismos.

Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención como fitosanitario frente a microorganismos.

30 Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención para el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por microorganismos en plantas.

Otro aspecto de la invención está relacionado con un método para incrementar la resistencia de una planta frente a por lo menos un microorganismo patógeno, que
35 comprende por lo menos las etapas:

a) aplicar una composición a una planta donde dicha composición comprende por lo menos la proteína o el péptido obtenido a partir de dicha proteína, tal como se define en el primer aspecto de la presente invención, y un vehículo;

- 5 b) donde la proteína o el péptido de la etapa a) tiene un efecto en la planta de manera que dicha proteína o péptido produce un incremento en la resistencia a por lo menos un microorganismo en la planta, comparada con la resistencia a ese microorganismo en la planta en la ausencia de la aplicación de dicha composición;
- 10 c) opcionalmente, monitorizar del crecimiento del microorganismo en la planta tratada, frente a una planta sin tratar.

En una realización preferida de este método, el tiempo de la etapa a) está en un rango entre 24 horas hasta 65 horas y la composición de la etapa a) comprende un vehículo
15 que es una solución nutritiva o una disolución acuosa con un pH en un rango entre 4,5-8 y donde la composición del apartado a) tiene un pH en un rango entre 4,5-8.

En una realización preferida de este método el microorganismo es una bacteria que se selecciona de una lista que consiste en, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium*
20 *tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*, y/o un hongo que se selecciona de una lista que consiste en, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

En una realización preferida de este método, la planta de la etapa a) ha sido previamente
25 infectada con un organismo patógeno. Preferiblemente, la planta es de la familia solanáceas.

EJEMPLOS

30 Ejemplo 1- Obtención de proteínas del apoplasto de plantas.

Proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO:
2.

Tomates de la variedad Ailsa Craig de 1 mes de edad se trataron con 20 ml de 1-
35 metiltriptófano (5 mM) disuelto en una solución nutritiva at pH = 6 durante 48 h. Después

se procedió a la extracción de las proteínas del apoplasto mediante el método descrito a continuación en el ejemplo 4.

Ejemplo 2. Tratamiento e inoculación de plantas: Tomates de la variedad Ailsa Craig

5

A continuación, se procedió a evaluar la respuesta de la planta frente a microorganismos cuando esta se trató con 1-MT. Para ello se procedió a la infección de Tomates de la variedad Ailsa Craig con *Pseudomonas syringae* mediante la inmersión del tomate en la suspensión de *Pseudomonas syringae* del ejemplo 3. La bacteria se cultivó como se describe en el ejemplo 3. Se infectaron las hojas de la planta del tomate sin tratamiento previo y las plantas de tomate previamente tratadas con 1-metil-triptófano según el ejemplo 1 48 horas antes de la infección. Se infectan las plantas con la bacteria. Después de 48 y 72 horas de la infección se toman muestras del apoplasto de parte de las plantas.

15

Durante ese tiempo, hasta completar las 72 h, las plantas se mantuvieron a 25 °C, con una humedad de entre el 80 hasta el 100% y alternado periodos de luz y oscuridad (16 horas de luz y 8 de oscuridad) para evaluar la evolución de la infección.

	Control: planta infectada y no tratada con 1-MT	Planta infectada y tratada con 1-MT
% de área de hoja con síntomas	80%	20%

20

Tabla 1: Porcentaje de área foliar (%) con síntomas de la enfermedad producida por la bacteria *Pseudomonas syringae* en plantas del tomate infectadas y tratadas con 1-MT (con tratamiento con 1-MT como en el ejemplo 1) frente a plantas infectadas y no tratadas con 1- MT (control).

25

Tal y como indican los resultados de la tabla 1 el tratamiento con 1-MT consiguió reducir de manera significativa el % de área foliar que presentaba síntomas de la enfermedad. De manera que en la planta no tratada con 1-MT, el porcentaje del área de la hoja con

síntomas ascendía al 80% mientras que en la planta tratada el porcentaje se redujo a un 20%.

Además, se comprobó que la población bacteriana fue significativamente inferior en plantas tratadas frente a las no tratadas mostrándose una reducción promedio del 80% en el número de unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml) tras el tratamiento, lo cual demostró que el tratamiento es capaz de detener el desarrollo de la bacteria en el interior de la planta.

10 Ejemplo 3- Cultivo de la bacteria

La bacteria, *Pseudomonas syringae* pv. Tomato, cepa DC3000, mantenida en crioconservación, se cultivó en placas KB que contenían los antibióticos apropiados durante 1 día a 28°C en oscuridad. Posteriormente, se cultivó en KB líquido durante 6h a 28°C en agitación (180rpm) para obtener el inóculo en fase exponencial de crecimiento. A continuación, se hizo una suspensión en MgSO₄ (10 mM) estéril a una concentración de 5x10⁵ ufc/mL.

20 Ejemplo 4: Método de extracción del apoplasto usado para los ejemplos 1 y 2.

A partir de hojas recolectadas de plantas tratadas con 1-metil triptófano de plantas infectadas o sin infectar, se procedió a extraer el apoplasto.

La extracción de apoplasto se llevó a cabo 48 horas después del tratamiento con 1-MT utilizando el método de infiltración-centrifugación descrito por O'Leary et al. (2014). Para las plantas que fueron infectadas con *Pseudomonas syringae*, la extracción de apoplasto se llevó a cabo 48 horas después de la inoculación de *Pseudomonas syringae* utilizando el método de infiltración-centrifugación descrito por O'Leary et al., J. Vis. Exp., 2014: 52113.

Para cada tratamiento se utilizaron la tercera y cuarta hoja de 10 plantas de un mes de edad. El método consistió en dos pasos. En el primer paso se sustituyó el espacio de aire apoplástico por agua destilada estéril, la cual se mezcla bien con el fluido apoplástico nativo. El segundo paso consistió en la recuperación de la mezcla de

infiltración/apoplástica centrifugando suavemente las hojas. La contaminación citoplasmática del apoplasto se estimó como se describe en Rico y Prestan (Mol. Plant. Microbe Interact., 2008, 21: 269-282). Antes de los siguientes análisis, el extracto de apoplasto se diluyó dos veces en agua destilada y se filtró usando una jeringa con un
 5 filtro de celulosa de tamaño de poro de 0,2 micras, para evitar la contaminación bacteriana. Este procedimiento se aplicó también a la extracción del apoplasto de plantas de control.

Ejemplo 5. Método de extracción de proteínas y péptidos de las plantas tratadas

10

Posteriormente, se realizó una extracción de las proteínas y los péptidos de las plantas del tomate tanto de las que se habían sido tratadas con 1-metil-triptófano (ejemplo1) como las que no (control) y de las que habían sido previamente infectadas, tratadas o sin tratar (ejemplo 2). Las proteínas se extrajeron desde el apoplasto obtenido según
 15 ejemplo 4.

Primero se realizó una separación de la fracción peptídica y la proteínica mediante precipitación. Para ello, se añadió acetonitrilo (ACN) y tras homogenizar la mezcla se centrifugó a velocidad máxima (14000rpm). La fracción sobrenadante contenía los
 20 péptidos y el precipitado las proteínas. El precipitado se secó en speedvac y se re-suspendió en tampón de lisis. Se solubilizan en el tampón de lisis (7M Urea, 1M TioUrea, 4% CHAPS, 25 mM Tris_HCl) para así solubilizar el mayor número de proteínas.

Primero se realizó el análisis de la fracción de proteína por SWATH, en un gel 1
 25 D_SDS_PAGE para eliminar contaminantes, limpiar muestras y proceder con la digestión en gel de las proteínas, cortándose posteriormente y digiriéndose con tripsina como se describe en Shevchenko et al., Proc. Nat. Acad. of Scien., of the U. S. A. 1996; 93:14440-14445.

Posteriormente se realizó el análisis del proteoma/peptidoma mediante cromatografía líquida seguida de espectroscopia de masas (LC-MSMS). Para ello se cargaron 1,5 µg de la muestra agrupada (muestras de fracción de proteínas) en una columna trampa (columna NanoLC, 3 µ C18-CL, 75µmx15cm; Eksigent) y se trató con 0.1% de trifluoroacético (TFA) a 3 µl/ min durante 5 min. Los péptidos se cargaron en una columna
 35 analítica (columna LC, 3 µ C18-CL, 75µmx12cm, Nikkyo) equilibrada añadiendo 5%

ACN y 0.1% ácido fórmico (AF). La elución de proteínas se llevó a cabo con un gradiente lineal de 5 a 35% de ACN durante 180 minutos a una velocidad de flujo de 300 nL/min. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). Los péptidos eluidos se ionizaron aplicando 2,8 kV al emisor de pulverización.

Los archivos de datos sin procesar (.wiff) obtenidos del experimento SWATH fueron analizados por el software PeakView v.2.1 (Sciex) bajo criterios y configuraciones restringidos: cinco péptidos, cinco transiciones, umbral de confianza del péptido al 95% y umbral de descubrimiento falso al 1%. Los datos cuantitativos obtenidos por Peak View se analizaron con Marker View 1.3 (Sciex). Para determinar las diferencias entre los diferentes tipos de muestras propuestas en este estudio, se realizó una transformación logarítmica de los datos. La biblioteca Glmnet de R se utilizó para aplicar una regresión logística con penalización por LASSO y Elastic net como métodos de selección para variables (proteínas) que muestran diferencias significativas entre los diferentes grupos.

Las proteínas expresadas diferencialmente se anotaron utilizando el software Blast2GO versión 5.1.13. Las secuencias de proteínas se compararon con la base de datos SwissProt utilizando el servicio público NCBI Blast (QBIast). El programa de alineamiento se configuró como blastp con un valor de expectativa de explosión (valor E) 1×10^{-5} . Las coincidencias significativas del análisis Blast2GO se ordenaron en categorías (componente celular, función molecular y proceso biológico). La alineación Blast clásica que se derivaba de los péptidos señal N-terminales y la proteína secretada no clásica se predijeron usando SignalP (versión 4.1).

Una vez secuenciado el proteoma del apoplasto de plantas tratadas con 1-metil-triptófano (ejemplo1) se identificaron las proteínas aisladas que comprenden una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: XP_004243707.1 o SEQ ID NO: XP_004244317.1. respectivamente. Estas proteínas pueden ser producidas, purificadas y aplicadas en plantas para evitar el crecimiento de bacterias u otros patógenos.

Ejemplo 6. Síntesis de proteínas aisladas que comprenden una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO:2

35

La proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 de acuerdo con el primer aspecto, se ha obtenido también mediante transformación de *E coli* usando el Sistema pET. Para ello, el gen diana se ha clonado en el plásmido pET-14b bajo el control del promotor del bacteriófago T7. Su expresión se indujo proporcionando una fuente de ARN polimerasa de T7 en la célula huésped. Una vez clonado, el plásmido se transfirió a huéspedes de expresión como *E coli* BL21 que contienen una copia cromosómica del gen de ARN polimerasa de T7 bajo control del promotor lacUVS, cuya expresión se induce mediante la adición de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosido (IPTG). La proteína se ha purificado utilizando el kit "HisPurrM Ni-NTA Spin Purification Kit" de ThermoFisher", siguiendo las instrucciones del fabricante. La proteína purificada se usó a continuación para probar su actividad antimicrobiana *in vitro*.

Los experimentos *in vitro* se realizaron en medio mínimo M9 suplementado con proteína recombinante purificada a una concentración de 12 a 70 μ g/ml o con PBS (solución salina tamponada con fosfato (Thermo Scientific). El pH del medio se ajustó a 5,8, antes de añadir la bacteria.

Ejemplo 7. Tratamiento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* con la proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2.

Una suspensión que comprende la proteína obtenida en el ejemplo 1 o en el ejemplo 6 se ha aplicado, *in vitro*, a un cultivo de *Pseudomonas syringae* en medio líquido (medio mínimo M9) a una concentración inicial de 10^6 ufc/ml con una concentración de la proteína de 12 a 70 μ g/ml. El pH del medio se ajustó a 5,8, antes de añadir la bacteria. El crecimiento bacteriano se monitorizó midiendo la densidad óptica cada 10 min durante 72 h. Los resultados se muestran en la tabla 2.

30

Tiempo en horas	Control	Proteína aislada según SEQ ID NO: 2
0	0,1	0,095
10	0,12	0,13
24	0,42	0,16
36	0,65	0,14

Tabla 2: Titulación bacteriana (D=600 nm). Resultados de la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas syringae in vitro* en presencia de la proteína (Proteína aislada según SEQ ID NO: 2) frente al control (sin presencia de proteína).

5

Las bacterias en presencia de la proteína aislada según la SEQ ID NO: 2 pararon su crecimiento a las 10h del comienzo del tratamiento con la proteína aislada según SEQ ID NO: 2. Contrariamente, en ausencia de este tratamiento, el crecimiento siguió de manera continua y muy rápida hasta las 48h posteriores, en las que entraron en fase estacionaria. La reducción del crecimiento llegó hasta un 60% a las 24 horas y a más de un 80 % en 48 horas.

10

Los rangos de concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de la proteína aislada según la SEQ ID NO: 2 fueron testados: 70, 50, 25, 12.5, 6, 3 y 1.5. Se observó un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano en las concentraciones testadas, desde 70 hasta una concentración de $3\mu\text{g/ml}$.

15

Además, la proteína aislada según la SEQ ID NO: 2 ha demostrado un efecto inductor de defensa en planta, ya que las plantas a las que se les infiltró la proteína y posteriormente (24 h después) se inocularon con *Pseudomonas syringae* mostraron un descenso de los síntomas en plantas tratadas sistémicamente de hasta un 43% y un descenso de las poblaciones bacterianas de hasta un 60%.

20

REIVINDICACIONES

1. Uso de la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 o una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2, o de un péptido obtenido a partir de dicha proteína, para inducir resistencia frente a microorganismos en plantas y/o como biocida frente a microorganismos patógenos de plantas, donde la secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 y el péptido obtenido a partir de dicha proteína mantienen la función de la proteína que comprende la SEQ ID NO: 2 y donde los microorganismos se seleccionan de una lista que consiste en virus, bacterias y hongos patógenos de plantas.
2. Uso de la proteína o el péptido según la reivindicación anterior, donde las bacterias se seleccionan de una lista de géneros que consiste en, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Xylella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Micrococcus* y/o los hongos se seleccionan de una lista de géneros que consiste en, *Botrytis*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Streptomyces*, y *Apergillus*.
3. Uso de la proteína o el péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la bacteria se selecciona de una lista que consiste en, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* y/o el hongo se selecciona de una lista que consiste en, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y *Sclerotinia sclerotiorum*.
4. Uso de la proteína o de un péptido obtenido a partir de dicha proteína, tal como se define en la reivindicación 1, como fitosanitarios frente a microorganismos.
5. Uso de la proteína o de un péptido obtenido a partir de dicha proteína, tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por microorganismos en plantas.
6. Uso de la proteína o el péptido según la reivindicación 5, donde el microorganismo es una bacteria que se selecciona de una lista que consiste en, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia*

carotovora, *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* y/o un hongo que se selecciona de una lista que consiste en, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

5

7. Una composición que comprende una proteína o un péptido obtenido a partir de dicha proteína, tal y como se define en la reivindicación 1, y un excipiente químicamente aceptable.

10

8. La composición según la reivindicación anterior que presenta una forma sólida, semisólida, líquida, gel, aerosol o en forma de micropartículas.

9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 adecuada para uso agrícola o fitosanitario frente a microorganismos.

15

10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el excipiente puede ser un diluyente, un aglutinante, disgregante y/o lubricante.

20

11. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, como fitosanitario frente a microorganismos.

12. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por microorganismos en plantas.

25

13. Método para incrementar la resistencia de una planta frente a al menos un microorganismo patógeno, que comprende por lo menos las etapas:

30

a) aplicar una composición a una planta donde dicha composición comprende por lo menos la proteína o el péptido obtenido a partir de dicha proteína, tal como se define en la reivindicación 1, y un vehículo;

35

b) donde la proteína o el péptido de la etapa a) tiene un efecto en la planta de manera que dicha proteína o péptido produce un incremento en la resistencia a por lo menos un microorganismo en la planta, comparada con la resistencia a ese microorganismo en la

planta en ausencia de la aplicación de dicha composición;

c) opcionalmente, monitorizar del crecimiento del microorganismo en la planta tratada, frente a una planta sin tratar.

5

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, donde el vehículo es una solución nutritiva o una disolución acuosa con un pH en un rango entre 4,5-8 y donde el pH de la composición está en un rango entre 4,5-8.

10

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde el microorganismo es una bacteria que se selecciona de una lista que consiste en, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensi*, *Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*, y/o un hongo que se selecciona de una lista que consiste en, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxiosporium* y

15

Sclerotinia sclerotiorum.