

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 722**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2006 E 06780077 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 1907550**

54 Título: **Proteína extraída de plantas del género *Lupinus* o producida en forma recombinante, secuencia de nucleótidos que la codifica y su uso en nutrición animal, como promotor del crecimiento vegetal y en la lucha contra hongos patógenos**

30 Prioridad:

21.07.2005 PT 10332205

28.06.2006 PT 10351106

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.02.2013

73 Titular/es:

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA (20.0%)

EDIFICIO INOVISA TAPADA DA AJUDA

1349-017 LISBOA, PT;

DE SEIXAS BOAVIDA FERREIRA, RICARDO

MANUEL (20.0%);

VALADAS DA SILVA MONTEIRO, SARA

ALEXANDRA (20.0%);

NASCIMENTO TEIXEIRA, ARTUR RICARDO

(20.0%) y

BORGES LOUREIRO, VIRGILIO (20.0%)

72 Inventor/es:

DE SEIXAS BOAVIDA FERREIRA, RICARDO

MANUEL;

VALADAS DA SILVA MONTEIRO, SARA

ALEXANDRA;

NASCIMENTO TEIXEIRA, ARTUR RICARDO y

BORGES LOUREIRO, VIRGÍLIO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 396 722 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteína extraída de plantas del género *Lupinus* o producida en forma recombinante, secuencia de nucleótidos que la codifica y su uso en nutrición animal, como promotor del crecimiento vegetal y en la lucha contra hongos patógenos.

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención está incluida en el área de Biología, con su aplicabilidad práctica como fungicida, insecticida, promotor de crecimiento o fertilizante que pertenece a los campos de las Ciencias Agronómicas y Agrícolas y debido a su aplicabilidad como complemento en la dieta de animales pertenece al campo de Nutrición Humana y Animal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Esta invención se refiere a una proteína con propiedades antifúngicas, anti-oomicetos y promotoras del crecimiento vegetal, extraída de semillas, cotiledones o plántulas del género *Lupinus*, y a su aplicación en el control de agentes patógenos que atacan a las plantas y como un bioestimulante vegetal. Esta proteína se puede aplicar directamente a las plantas, o las plantas se pueden modificar genéticamente para que expresen la proteína en sus tejidos. Además, debido a sus características inherentes inusuales, la proteína se puede utilizar en la preparación de concentrados de
15 proteína útiles como complementos en la dieta de seres humanos y otros animales.

La presente solicitud también describe la secuencia de nucleótidos del DNA correspondiente al fragmento de gen que codifica la proteína de *Lupinus*, así como a su secuencia de residuos de aminoácidos, a microorganismos transformados con el fragmento de gen que codifica la proteína de *Lupinus* y a métodos para su aplicación como un fungicida, insecticida, promotor de crecimiento vegetal o fertilizante o como un complemento en la nutrición humana
20 o animal.

También se describe la proteína caracterizada por la secuencia de residuos de aminoácidos antes citada, en la cual uno o más residuos de aminoácidos están ausentes, han sido sustituidos o añadidos, o mantiene su actividad biológica después de ser sometida a modificación química, tal como, por ejemplo, glicosilación.

El control de agentes patógenos constituye un problema serio a nivel mundial con respecto a las cosechas más importantes. Los hongos patógenos son particularmente importantes en lo que respecta al almacenamiento de productos agrícolas. En la actualidad, el control sobre el crecimiento fúngico generalmente se logra mediante aplicaciones masivas de fungicidas químicos. Sin embargo, los productos fitofarmacéuticos actualmente disponibles en el mercado muestran varias desventajas graves. Por un lado, presentan costos económicos y ambientales elevados; por otro lado, muchas especies fúngicas han desarrollado mecanismos de resistencia contra algunos fungicidas importantes, haciéndolos frecuentemente obsoletos un par de años después de su introducción al mercado.
25

Aún cuando las plantas no poseen un sistema inmunológico que se parezca al de los animales, han desarrollado una resistencia inherente hacia el ataque de hongos patógenos. Sin embargo, las técnicas utilizadas para cultivo, cosecha y almacenamiento de plantas en la agricultura moderna promueven con mucha frecuencia condiciones adecuadas u óptimas para el desarrollo de agentes patógenos.
30

Además, es bastante el alto número de agentes patógenos microbianos que pueden afectar y perjudicar a las cosechas de plantas. Como un ejemplo, se puede hacer referencia a los siguientes géneros: *Alternaria*, *Ascochyta*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Erysiphe*, *Fusarium*, *Gaeumanomyces*, *Macrophomina*, *Nectria*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phymatotrichum*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Puccinia*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Uncinula*, y *Verticillium*. La aplicación de los fungicidas actualmente disponibles en el mercado está limitada a algunos de estos géneros, y no es una solución eficaz para el control de infecciones vegetales.
35

Una estrategia alternativa en la lucha contra agentes patógenos microbianos es la identificación y purificación de sustancias de origen biológico que tengan actividad anti-fúngica potente. La identificación de dichos compuestos implica investigar una variedad de organismos, tales como plantas y microorganismos, respecto a sustancias que posteriormente se analizan en pruebas antifúngicas y finalmente se aíslan y caracterizan.
40

De esta manera, ya se han aislado muchas clases de proteínas antifúngicas, incluyendo quitinasas, proteínas ricas en cisteína que se unen fuertemente a la quitina, β -1,3-glucanasas, permeatinas, tioninas y proteínas para transferencia de lípidos. Se cree que estas proteínas desempeñan un papel fundamental en las defensas naturales de las plantas contra el ataque de agentes patógenos.
45

En la literatura técnica disponible se describen varias metodologías sobre la utilización de proteínas antifúngicas, extraídas de plantas o microorganismos, ya sea para aplicación directa sobre los agentes patógenos, o en plantas transgénicas que expresen dichas proteínas. Las proteínas antifúngicas utilizadas con mayor frecuencia en estas metodologías incluyen quitinasas, glucanasas, proteínas tipo osmotina y lisozimas. Varios estudios han demostrado que las plantas genéticamente modificadas que sobre-expresan estas proteínas presentan una mayor resistencia a muchos agentes patógenos (Patente Europea N° 0392225).
50

Las técnicas modernas de Biología Molecular permitieron el desarrollo de tecnología de DNA recombinante y, por consiguiente, la transformación de plantas con genes que codifican proteínas antifúngicas. Este procedimiento
55

normalmente implica la inserción del gen que codifica la proteína de interés en un tejido vegetal, seguido por regeneración de una planta completa a partir del tejido vegetal genéticamente modificado.

Sin embargo, la actividad de algunas de estas proteínas se ve reducida por la presencia de iones, en particular potasio, sodio o calcio. Por esta razón, aunque las proteínas pueden exhibir una actividad antifúngica potente en pruebas *in vitro*, éstas pueden ser ineficaces *in vivo* debido a las elevadas concentraciones fisiológicas de los iones que están presentes en forma natural en los tejidos vegetales transformados.

En conclusión, se hace imperativa la identificación y purificación de nuevos compuestos de origen biológico que presenten propiedades anti-patógenos en la lucha contra los agentes patógenos que afectan a las plantas. Se debe dar importancia particular a los compuestos que sean eficaces sobre una gama amplia de agentes patógenos y que mantengan la actividad biológica bajo condiciones *in vivo*.

Las prácticas agrícolas se han optimizado, durante un intervalo de tiempo prolongado, para promover el crecimiento y desarrollo de plantas y para aumentar la producción de cosechas. Por otro lado, es predecible que, a medio a largo plazo, se pueda presentar una escasez de alimentos en muchas zonas del planeta. Las técnicas actuales para controlar el crecimiento de plantas bajo condiciones ambientalmente controladas son costosas y requieren equipos complejos. Por estas razones, muchos investigadores han investigado y descrito sustancias fisiológicamente activas, ya sea naturales o sintéticas, que exhiben un efecto de intensificación sobre el crecimiento y desarrollo de las cosechas. Sin embargo, sólo unas cuantas de estas sustancias han encontrado aplicación práctica bajo condiciones agrícolas reales. Por lo tanto, también es cada vez más importante descubrir o desarrollar promotores de crecimiento vegetal que no sean agresivos para el medio ambiente y que no presenten toxicidad para los seres humanos, animales y el medio ambiente.

Las plantas leguminosas o, de manera más específica, sus semillas, son consideradas como la principal fuente de proteínas a nivel mundial para la nutrición de seres humanos y animales. En este sentido, la semilla de soja cumple un papel prominente, no sólo por el alto contenido de proteínas y calidad de sus semillas sino también por su riqueza en aceite. Sin embargo, desde el punto de vista agrícola, la semilla de soja requiere suelos fértiles y un suministro abundante de agua. Las plantas que pertenecen al género *Lupinus* han conquistado, a través de las últimas décadas, una posición relevante, fuerte y de gran potencial en comparación con la semilla de soja. Si, por un lado, sus semillas poseen niveles de proteínas y aceite comparables con los de la semilla de soja, por otro lado, sus especies están bien adaptadas a suelos pobres y a condiciones de poca disponibilidad de agua. Por estas razones, los altramuces algunas veces han sido considerados como los "primos pobres" de la semilla de soja.

El alto nivel de alcaloides que son tóxicos para los animales y que están naturalmente presentes en las semillas de altramuz de tipo silvestre, tradicionales han impedido desde hace mucho el cultivo generalizado de las especies de *Lupinus* y el uso de sus semillas para consumo animal y humano. Esta es la principal razón por la cual el cultivo de altramuces ha quedado rezagado con respecto al cultivo de la semilla de soja. En Portugal, por ejemplo, el consumo tradicional de semillas de altramuces ha estado asociado desde hace mucho con la ingestión de cerveza. Estas semillas se hierven primero en agua (el calentamiento a 100°C destruye la capacidad de las semillas para germinar pero no bloquea el proceso de imbibición) y después se sumergen en agua corriente durante unos cuantos días para eliminar los alcaloides tóxicos. Sin embargo, la reciente aplicación de técnicas de selección permitió el desarrollo de las denominadas variedades de altramuz dulce, caracterizadas por contener un bajo contenido de alcaloides en la semilla (<0,004% p/p), en oposición a las variedades de cultivo más amargas tradicionales (contenido de alcaloide >0,004% p/p). Por esta razón, las semillas de las variedades de altramuz dulce se pueden utilizar en forma segura como alimento para seres humanos y animales.

Por lo tanto, es predecible un desarrollo cada vez mayor de productos alimenticios procedentes del altramuz para nutrición tanto de seres humanos como de animales, como ha sucedido desde hace varias décadas con la semilla de soja. Esto es particularmente importante en el caso de proteínas de semilla de altramuz, ya sean albúminas o globulinas.

Ramos et al., (1997) *Planta* 203(1): 26-34 describen la acumulación de productos de descomposición similares a lectinas del catabolismo de la beta-conglutina en cotiledones de semillas de *Lupinus albus* L.

El documento DATABASE UniProt[Online] "*Beta-conglutin*" del 16 de agosto de 2004, describe la secuencia polipeptídica completa de la proteína precursora de beta-conglutina de *L. albus*. El documento DATABASE UniProt[Online] "*Vicilin-like protein (fragment)*" de 24 de mayo de 2005 describe la secuencia polipeptídica de una proteína similar a vicilina de *L. albus*.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se espera que la presente invención solucione el problema técnico asociado con la identificación y purificación de compuestos de origen biológico que sean capaces de controlar una amplia variedad de agentes patógenos que afectan a las cosechas de plantas y que actúen como promotores de crecimiento de las plantas mientras que mantienen sus actividades biológicas bajo condiciones *in vivo*.

La solución se basa en el descubrimiento e identificación mediante la presente invención de una proteína presente en plantas que pertenecen al género *Lupinus*, que exhibe las siguientes características inusuales: (i) una potente actividad antifúngica y anti-oomicetos, la cual le confiere gran potencial como fungicida; (ii) una fuerte actividad

promotora del crecimiento plantas, particularmente notable en plantas enfermas o naturalmente debilitadas; (iii) una resistencia extrema a la desnaturalización, lo que permite su uso bajo condiciones de campo; (iv) una susceptibilidad muy alta hacia la proteólisis, lo que la hace inocua para el medio ambiente y no tóxica para los seres humanos y animales; y (v) una composición de aminoácidos muy equilibrada.

5 Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de una proteína de secuencia B en agricultura como agente anti-fúngico o anti-oomicetos en el que dicha proteína se aplica a una planta.

Preferiblemente, en dicho uso, dicha proteína ha sido glicosilada, fosforilada, alquilada y/o prenilada. En realizaciones preferidas dicha proteína está en la forma de una formulación, preparación o extracto en bruto parcialmente purificado de una planta de tipo natural o genéticamente modificada o de un cultivo de células transformadas procedentes de una planta, animal o microorganismo, preferiblemente en donde dicha proteína está en la forma de un extracto en bruto del género *Lupinus*, en donde dicho extracto es de cotiledones de *Lupinus*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Hojas de vid altamente infectadas intensamente con mildiú pulverulento se pulverizaron con agua (hoja de la derecha) o con la proteína extraída de *Lupinus* (hoja de la izquierda). (A) 24 horas después de la pulverización; (B) 2 meses después de la pulverización.

Figura 2.- Observaciones por microscopía óptica de la germinación de esporas provenientes del hongo responsable del mildiú pulverulento en vid. Las esporas fúngicas se retiraron cuidadosamente de la superficie de hojas de vid jóvenes infectadas y se inocularon en agar-agar con agua al 0,6% (p/v). (A), (B) y (C) - Controles; (D) y (E) - adición de 200 µg de la fracción de proteína total proveniente de uvas maduras, que contenían proteínas relacionadas con la patogénesis (PR); (F) y (G) - adición de 200 µg de la proteína extraída de *Lupinus*. El resultado de cada ensayo se observó después de 24 y 48 horas. Se utilizó microscopía de contraste de fases y se usaron 25 aumentos.

Figura 3.- Observaciones con microscopio metalúrgico de hojas de vid. (A) Hojas sanas; (B) Hojas infectadas con mildiú pulverulento; (C) Hojas infectadas con mildiú pulverulento, 12 horas después de ser pulverizadas con la proteína extraída de *Lupinus*. El número de aumentos utilizado se especifica en cada fotografía.

Figura 4.- Efecto de la proteína proveniente de *Lupinus*, producida en una forma recombinante en *Escherichia coli*, sobre la germinación y desarrollo de esporas de *Uncinula necator*, el agente causante del mildiú pulverulento.

Figura 5.- Se pulverizaron plantas de rosal en la misma etapa de desarrollo con agua (planta de rosal a la derecha) o con una solución que contenía la proteína extraída de *Lupinus* (200 µg de proteína/ml; planta de rosal a la izquierda). La fotografía muestra la etapa de desarrollo de ambas plantas tres semanas después de la pulverización.

Figura 6.- Plantas de sandía producidas en un vivero. Seis semanas después del inicio de la germinación las plantas se pulverizaron con agua (control; A), un extracto crudo de *Lupinus* que contenía 100 µg de proteína/ml, (B), un promotor de crecimiento de plantas comercialmente disponible en el mercado (concentración recomendada por el fabricante) (C), y un extracto crudo de *Lupinus* que contenía 200 µg de proteína/ml (D). El experimento se siguió durante dos semanas y se fotografiaron las plantas.

Figura 7.- Perfil típico de la insolubilidad de las globulinas provenientes de plantas del género *Lupinus* en función de las concentraciones de calcio y magnesio. Este perfil se ilustra como ejemplo para mostrar el efecto de estos cationes sobre la auto-agregación de la proteína extraída de *Lupinus* (■) y de β-conglutina de *Lupinus* (O). β-conglutina (0,5 mg·ml⁻¹; O) y las proteínas extraídas de *Lupinus* (0,5 mg·ml⁻¹; ■) se purificaron a partir de semillas secas o a partir de cotiledones desprendidos de plántulas que habían germinado y crecido durante ocho días, respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una nueva proteína con potentes propiedades anti-fúngicas, la cual exhibe una actividad potente sobre la germinación y desarrollo de esporas provenientes de patógenos fúngicos y de oomicetos para plantas, y con actividad de promotor de crecimiento de plantas, particularmente notable en plantas enfermas o naturalmente debilitadas. La invención también se refiere al uso de la proteína o cualquier preparación que la contenga como un complemento en la nutrición humana o animal. La secuencia de nucleótidos del DNA del fragmento de gen que codifica la proteína de *Lupinus* no comparte ninguna homología significativa con cualquier otra proteína antifúngica que haya sido aislada de plantas. La proteína de *Lupinus* constituye un nuevo tipo de proteína entre las proteínas antifúngicas descritas en plantas.

La proteína a la que se refiere la presente invención se purifica a partir de cotiledones extraídos de plántulas germinadas del género *Lupinus*. La presente solicitud incluye la descripción de la metodología utilizada para aislar la proteína de tejidos vegetales, la secuencia de nucleótidos del DNA del fragmento de gen (A) que la codifica y la secuencia correspondiente de residuos de aminoácidos (B).

(A)

5'CGTAGACAAAGGAACCCTTATCACTTCAGCTCTCAAAGATTCCAAACTCT
 TTACAAAAATAGGAATGGCAAAATCCGTGTG CTCGAGAGGTTTGAC-
 CAAAGAACCAATAGACTTGAGAATCTCCAAACTACCGCATTGTTGAGTTC
 CAATCAAAACCTAACA CTCTCATTCTCCCTAAACACTCTGATGCTGAC-
 TACGTCCCTCGTTGTACTCAATGGTAGAGCCACAATCACGATAGTAAACCC
 TGATAGAAGACAAGCATATAACCTTGAGTATGGCGATGCTCTCAGAATCCC
 AGCTGGCTCAACTTCATATATCCTTAACCCG GATGACAACCAGAAGCTTA-
 GAGTAGTCAAGCTCGCAATACCCATCAACAATCCTGGCTACTTTTATGATT
 TCTATCCATCGA GTACTAAAGACCAACAATCCTACTTCAGTG-
 GCTTCAGCAGGAACACTTTAGAGGCCACCTTCAATACTCGTTATGAAGAGA
 T ACAAAGGATTATTTTAGGGAATGAGGAT 3'

(B)

5' RRQRNPYHFS SQRFQTL YKN RNgKIRVLER FDQRTNRLN
 LQNYRIVEFQ SKPNTLILPK HSDADYVLVV LNGRA TITIV NPDRRQAYNL
 EYGDALRIPA GSTSYILNPD DNQKLRVVKL AIPINPGYF YDFYPSSTKD
 QQSYFSGFSR NTLEATFNTR YEEIQRILG NED 3'

Esta proteína parece presentarse naturalmente sólo durante un periodo muy corto en el tiempo de vida de plántulas del género *Lupinus*. Los autores de la presente invención han demostrado que la β -conglutina, la más importante proteína de reserva de semillas del género *Lupinus*, es el precursor biosintético de la proteína de *Lupinus*. En efecto, la proteína de *Lupinus* es una proteína altamente procesada que ha experimentado varios niveles de modificación química. Esto aumenta enormemente la dificultad de su estudio, incluyendo la secuenciación de los residuos de aminoácidos y de los nucleótidos correspondientes. Durante la formación de la semilla, el gen que codifica la β -conglutina se transcribe en el mRNA correspondiente, cuya traducción da como resultado la síntesis del precursor biosintético de β -conglutina. Este precursor se procesa después exhaustivamente, incluyendo glicosilación, a partir de lo cual se producen las varias decenas de tipos diferentes de subunidades que constituyen la β -conglutina. En el siguiente ciclo de crecimiento de las plantas, varios días después del inicio de la germinación, las etapas iniciales en el catabolismo de la β -conglutina implican la escisión proteolítica de todas o de la mayoría de sus subunidades constitutivas, lo que da como resultado la acumulación de la proteína descrita en esta solicitud. Debido a sus propiedades antifúngicas intrínsecas, las cuales son naturalmente explotadas por la planta hospedante, esta proteína se mantiene en concentraciones muy altas en los cotiledones de las plantas en desarrollo, durante una etapa de vida en la cual la planta es más sensible al ataque por hongos y por insectos. Después de unos cuantos días, la proteína es degradada y sus aminoácidos se utilizan en el crecimiento de la planta joven.

La proteína de *Lupinus* descrita en la presente solicitud presenta algunas propiedades que la distinguen de las otras proteínas antifúngicas descritas en la literatura técnica. Esto la convierte en un objetivo prometedor con gran potencial para desarrollar un método eficiente para controlar los hongos que afectan a plantas y/o animales:

- (1) Potente actividad antifúngica y anti-oomicetos, que le confiere gran potencial a la proteína como fungicida,
- (2) Fuerte actividad de promotor del crecimiento de plantas, particularmente notable en plantas enfermas o naturalmente debilitadas,
- (3) Resistencia extrema a la desnaturalización, lo que permite el uso de la proteína bajo condiciones de campo,
- (4) Gran susceptibilidad al ataque proteolítico, lo cual la hace inocua para el medio ambiente y no tóxica para los seres humanos, y
- (5) Una composición de aminoácidos muy equilibrada.

La proteína también se puede utilizar como insecticida, promotor del crecimiento o fertilizante, y como un complemento alimenticio en la nutrición humana o animal.

Dos problemas prácticos en la agricultura de hoy en día son la reducción o inhibición del crecimiento observada en plantas enfermas o naturalmente debilitadas y la toxicidad normalmente asociada con los bioestimulantes disponibles. La proteína extraída de tejidos vegetales de *Lupinus* exhibe una fuerte actividad de promotor del crecimiento durante el crecimiento y desarrollo de la planta. En efecto, las preparaciones o extractos de *Lupinus* que contienen la proteína poseen una fuerte actividad bioestimulante en todas las plantas analizadas, incluyendo, por

ejemplo, plantas de vid, rosas, sandía y tomate. Este efecto es notorio para concentraciones de proteína iguales o mayores que 200 µg/ml. Los otros componentes presentes en extractos no puros de la proteína de *Lupinus* añaden valor a las preparaciones debido a que actúan como un fertilizante foliar. La ausencia de toxicidad de la proteína de *Lupinus* para seres humanos, animales y el medio ambiente indica que su aplicación en agricultura no tiene ningún efecto dañino sobre el medio ambiente.

Otra descripción de la presente solicitud se refiere a la metodología utilizada para la producción recombinante de la proteína de *Lupinus* en bacterias, con el objetivo de expresarla en forma constitutiva en plantas genéticamente modificadas. Eventualmente, estas plantas pueden presentar un alto nivel de resistencia a hongos patógenos, concretamente respecto a los hongos de difícil control (como en el caso de los hongos responsables de las denominadas enfermedades de la madera), contra los cuales los fungicidas tradicionales de aplicación exógena no son del todo eficaces.

La proteína se extrajo de plántulas de *Lupinus albus* cv. LeBlanc de ocho días. Las semillas se colocaron en una habitación a temperatura constante (25°C por el día, 20°C por la noche) con un fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad.

Después de la cosecha, los cotiledones se congelaron en nitrógeno líquido. La extracción de proteínas se efectuó en solución tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, que contenía NaCl al 10% (p/v), EDTA (ácido etilendiamintetraacético) 10 mM y de EGTA (ácido etilenglicol bis(éter β-aminoétilico)-N,N,N',N'-tetraacético) 10 mM. Después de un periodo de incubación de 30 minutos a 4°C, el extracto se centrifugó a 30.000 g, durante 1 hora a 4°C. Se eliminó la sal del líquido sobrenadante y la proteína extraída de *Lupinus* se purificó posteriormente por FPLC (cromatografía líquida rápida de péptidos y proteínas)-cromatografía de intercambio aniónico.

La secuenciación del N-terminal de la proteína extraída de *Lupinus* se logró mediante degradación de Edman. La secuencia obtenida de residuos de aminoácidos se utilizó para diseñar cebadores degenerados. El mRNA total se extrajo de semillas en desarrollo de *Lupinus albus* en una etapa en la cual ocurre la síntesis máxima del precursor de β-conglutina. La extracción del mRNA se efectuó utilizando protocolos/kits para purificación de mRNA a partir de material vegetal. El cDNA correspondiente al fragmento de gen que codifica la proteína extraída de *Lupinus* se amplificó mediante PCR (reacción en cadena de polimerasa) utilizando los cebadores degenerados previamente diseñados. Utilizando la secuencia de nucleótidos obtenida como molde, se diseñaron nuevos cebadores y se consiguió la secuencia de nucleótidos completa del fragmento de gen que codifica la proteína extraída de *Lupinus* utilizando la técnica 3' y 5' RACE (amplificación rápida de los extremos del cDNA).

La proteína de *Lupinus* se produjo en forma recombinante en la bacteria *Escherichia coli*. El fragmento de gen que codifica la proteína de *Lupinus* se clonó en un vector apropiado, lo que permitió la asociación del gen de interés al promotor *T7lac*. Este promotor es inductivo; por lo tanto, la expresión de los genes que están asociados con él ocurre exclusivamente en presencia del azúcar isopropilto-β-galactósido. Por último, se transformaron las células competentes de *Escherichia coli*.

Como se describió anteriormente, la proteína de *Lupinus* se obtiene en una forma recombinante en bacterias. Sin embargo, para ser analizada respecto a su actividad antifúngica, la proteína recombinante de *Lupinus* tiene que aislarse de todas las otras proteínas bacterianas. Para este fin, la proteína de *Lupinus* se produce previamente en una forma recombinante con una cola de residuos de histidina (cola de His). La metodología utilizada para su purificación se basa en la alta afinidad de los iones níquel para la cola de His. De esta manera, se logra la purificación de la proteína recombinante teniendo iones níquel unidos a una matriz de agarosa, sabiendo que entre todas las proteínas presentes en el extracto total bacteriano, únicamente la proteína de *Lupinus* se une a la matriz de agarosa. Posteriormente, se recupera la proteína de *Lupinus* después de un conjunto apropiado de lavados y eluciones, y la cola de His se retira después del tratamiento con una enzima proteolítica apropiada.

La elección cuidadosa de un promotor apropiado es un pre-requisito para la modificación genética de plantas. En la literatura técnica se describen varios tipos de promotores, que permiten la expresión de los genes asociados. Para expresar el fragmento de gen que codifica la proteína descrita en la presente invención, el promotor seleccionado puede ser inductivo o constitutivo, dependiendo del tipo de expresión requerida. La elección del promotor también es importante para dirigir la proteína sintetizada hacia el tejido o compartimento celular seleccionado (modificaciones posteriores a la transcripción).

La transformación de la planta se puede lograr utilizando metodologías diferentes tales como, transformación de la planta mediante *Agrobacterium*, transformación de protoplastos, transferencia de genes a granos de polen, inyección directa dentro de órganos reproductores o embriones inmaduros, y bombardeo de partículas. Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas específicas. No obstante, todos estos ya han sido utilizados en tipos diferentes de plantas.

Para transformar plantas con el fragmento de gen que codifica la proteína de *Lupinus*, el método seleccionado fue la transformación mediante *Agrobacterium* (Fraley et al., 1983), utilizando un vector de expresión apropiado, que contiene una región codificadora del gen de interés asociada a un gen marcador apropiado. La regeneración de plantas, desarrollo de plantas y transferencia de plantas al medio de cultivo a partir de un solo protoplasto se puede lograr siguiendo varias metodologías disponibles en la literatura técnica. Este procedimiento incluye varias etapas en la selección de células transformadas y el cultivo posterior de estas células mediante los métodos usuales

empleados en el desarrollo de cultivos embriogénicos. Las plántulas regeneradas finalmente se cultivan en un medio de cultivo apropiado, normalmente tierra.

También es un objetivo de la presente invención cualquier formulación agrícola que incluya como ingrediente activo la proteína de la secuencia B.

5 Otro aspecto descrito por la presente solicitud se refiere a los frecuentes niveles reducidos en proteínas vegetales de las dietas para seres humanos y animales y, en algunos casos, a la baja digestibilidad de las proteínas y a una composición no equilibrada de aminoácidos. De hecho, los preparados en bruto que contienen la proteína de *Lupinus* poseen no sólo una globulina importante (la proteína de *Lupinus*, objeto de la presente invención) sino también una variedad de albúminas que están presentes de forma natural en el material vegetal utilizado en la extracción de proteínas. Por lo tanto, estas preparaciones en bruto de la proteína de *Lupinus* son particularmente ricas en proteínas y se pueden utilizar como un complemento proteínico en la nutrición de animales o seres humanos como tofu (después de precipitar la globulina con calcio y magnesio) o como ricotta (después de precipitar las albúminas).

15 El análisis de la composición de aminoácidos de la proteína de *Lupinus* y su gran susceptibilidad a todas las proteasas analizadas (incluyendo tripsina, quimiotripsina, subtilisina, proteinasa K y pronasa) indica que esta proteína tiene un elevado valor nutritivo para los animales. Sin embargo, la proteína considerada en la presente solicitud es una globulina. Por esta razón, la proteína de *Lupinus* es insoluble en agua y en soluciones salinas diluidas, pero es fácilmente soluble en soluciones de alta fuerza iónica. No obstante, las globulinas de leguminosas son insolubles solamente cuando están en presencia de calcio, magnesio y otros cationes alcalino-térreos (Ferreira et al., 1999). Estos cationes divalentes, cargados positivamente a valores de pH neutro, actúan como puentes electrostáticos entre las moléculas de globulina cargadas negativamente, promoviendo o induciendo su auto-agregación en complejos que son tan grandes que se vuelven insolubles (Ferreira et al., 1999; Ferreira et al., 2003). Tofú, por ejemplo, es una cuajada similar al queso o al requesón que se prepara añadiendo iones calcio y magnesio a un extracto caliente de semillas de soja. Ambos cationes se utilizan de forma rutinaria en la preparación de tofu y se pueden conseguir comercialmente en forma de Nigari®. De esta manera, se puede utilizar una preparación en bruto de la proteína de *Lupinus*, que contiene tanto globulinas como albúminas, en la preparación de concentrados de globulina de *Lupinus* después de su precipitación con calcio y/o magnesio. La Figura 7, por ejemplo, muestra el patrón de precipitación de la proteína de *Lupinus* (■) en función de las concentraciones añadidas de calcio y magnesio. Con fines comparativos, también se presenta el perfil de precipitación de su proteína precursora, la β -conglutina (la principal proteína de reserva presente en semillas de *Lupinus*; O). Las albúminas que permanecen en el suero resultante también se pueden recuperar, por ejemplo, mediante precipitación térmica, en un procedimiento similar al utilizado en la preparación de ricotta (precipitación térmica de las albúminas lácteas que permanecen en el suero después de la retirada de la caseína durante la elaboración de queso). De esta manera se pueden utilizar las preparaciones que contienen la proteína de *Lupinus* como un complemento proteínico en la dieta de seres humanos o animales.

Para entender el potencial de la presente invención, se presentan varios ejemplos prácticos. Sin embargo, estos ejemplos no son limitativos en el sentido que se pueden utilizar metodologías alternativas en la utilización de la proteína de *Lupinus* como agente para control antifúngico y de oomicetos, como insecticida, como promotor de crecimiento, como fertilizante o como complemento proteínico en la dieta de seres humanos o animales.

40 EJEMPLOS

Ejemplos 1 y 2.- Efecto de pulverizar la proteína de *Lupinus* sobre la superficie de hojas de vid infectadas con el hongo *Uncinula necator* (el agente causante de mildiú pulverulento en la vid).

Se evaluó la actividad antifúngica de la proteína de *Lupinus* después de pulverizar la superficie de una hoja de planta de vid con una solución que contenía 200 mg de proteína pura/ml. Como control, se pulverizó una hoja similar bajo condiciones idénticas con agua. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 1 y muestran que la hoja de vid permanece sana dos meses después de pulverizar las hojas con la proteína, sin rastros de la presencia del hongo, incluso aunque las hojas pulverizadas estuvieron siempre y permanentemente en contacto cercano con hojas altamente infectadas.

Se efectuó otra prueba siguiendo una metodología idéntica, pero las observaciones de las superficies de las hojas de vid tratadas se efectuaron utilizando un microscopio metalúrgico (Figura 3).

Ejemplo 3.- Efecto de la proteína de *Lupinus* sobre la germinación y desarrollo de esporas de *Uncinula necator*.

Se retiraron esporas del hongo *Uncinula necator* de la superficie de hojas de vid infectadas y se inocularon en agar-agar con agua al 0,6%(p/v), que contenía 200 mg de proteína pura de *Lupinus* por ml, o 200 mg de la fracción de proteína total proveniente de uvas maduras (que contenían las proteínas PR) por ml. La germinación de las esporas y el desarrollo de los tubos germinales se siguió mediante microscopía óptica utilizando el sistema de lentes de fase de contraste, durante 24 y 48 horas. Los resultados obtenidos, presentados en la Figura 2, muestran que ocurrió una reducción marcada en presencia del medio que contenía la proteína de *Lupinus*, no sólo en el número de esporas germinadas, sino también en la longitud de los tubos germinales. Este efecto es notable cuando se comparó con el resultado observado en presencia de las proteínas PR.

Ejemplo 4.- Efecto de la proteína de *Lupinus* sobre la germinación y desarrollo de esporas del hongo *Phomopsis viticola* (el agente causante de excoriosis en las vides).

Se inocularon esporas del hongo *Phomopsis viticola* en medio PDA (agar-agar con dextrosa de patata). Después de 15 minutos, las esporas se retiraron y mezclaron con una solución que contenía la proteína de *Lupinus* en un volumen final de 25 ml. Estas gotas minúsculas se colocaron en placas de Petri y se cubrieron con portaobjetos, las cuales se sellaron posteriormente, creando una cámara húmeda. El desarrollo de las esporas se siguió mediante observaciones con microscopio óptico. Fue evidente una clara inhibición de la germinación de las esporas. Después de 24 horas las hifas en desarrollo experimentaron lisis.

Ejemplo 5.- Efecto de la proteína recombinante de *Lupinus* sobre la germinación de esporas del hongo *Uncinula necator*

Se purificó la proteína recombinante de *Lupinus*, expresada en bacterias, y se evaluó su actividad antifúngica. Estos ensayos se efectuaron como se describió previamente en los ejemplos 2 y 3. Los resultados obtenidos, presentados en la Figura 4, mostraron que la proteína recombinante presentó propiedades antifúngicas idénticas a las observadas para la proteína extraída de plantas de *Lupinus*. Después de un periodo de incubación de 48 horas en presencia de la proteína recombinante de *Lupinus*, se observó la destrucción de las paredes celulares de las esporas.

Ejemplo 6.- Efecto de la proteína recombinante de *Lupinus* sobre la germinación de esporas de oomicetos *Plasmopara viticola* (el agente causante del mildiú piloso)

Se retiraron esporas de oomicetos *Plasmopara viticola* de la superficie de hojas de vid infectadas y se colocaron en agar-agar con agua al 0,6% (p/v), que contenía 200 mg de proteína pura recombinante de *Lupinus* por ml. La germinación de las esporas se siguió durante 48 horas mediante observaciones por microscopía óptica. Como control se utilizó la germinación de las esporas en agar-agar con agua. Después de 24 horas, se destruyeron las paredes celulares de las esporas, con la liberación concomitante del contenido celular.

Ejemplo 7.- Efecto de pulverizar la proteína extraída de *Lupinus* sobre plantas de rosal.

Se evaluó la actividad bioestimulante de la proteína de *Lupinus* después de pulverizar las superficies foliares de un rosal con un extracto crudo de *Lupinus* que contenía 200 µg de proteína/ml. Como control, se pulverizó con agua un rosal en una etapa de desarrollo idéntica y se incubó bajo las mismas condiciones ambientales. El resultado obtenido, fotografiado tres semanas después de la pulverización, se presenta en la figura 5 y muestra un crecimiento superior para la planta pulverizada con la proteína de *Lupinus*, quedando demostrado por la aparición prematura de los primeros brotes florales.

Ejemplo 8.- Efecto de pulverizar la proteína extraída de *Lupinus* sobre plantas de sandía de vivero.

Se evaluó la actividad bioestimulante de la proteína de *Lupinus* después de pulverizar las superficies foliares de plantas de sandía de vivero de seis semanas con un extracto en bruto de *Lupinus* que contenía 200 µg de proteína/ml. El ensayo se efectuó bajo condiciones de invernadero y las plantas se pulverizaron con agua (control; A); un extracto en bruto de *Lupinus* que contenía 100 µg de proteína/ml (B); un promotor de crecimiento de plantas comercialmente disponible en el mercado (concentración recomendada por el fabricante) (C); y un extracto en bruto de *Lupinus* que contenía 200 µg de proteína/ml (D). Se utilizaron veinticuatro plantas en cada ensayo. El ensayo se siguió durante las dos semanas posteriores y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6. Las plantas pulverizadas con la concentración más alta de la proteína de *Lupinus* (200 µg de proteína/ml; D) presentaron el mayor desarrollo y un crecimiento foliar superior cuando se compararon con plantas tratadas con agua o con el promotor de crecimiento de plantas comercialmente disponible en el mercado. Las plantas pulverizadas con la concentración más baja de la proteína de *Lupinus* (100 µg de proteína/ml; B) presentaron un nivel más bajo de desarrollo pero siguió siendo superior al observado para las plantas pulverizadas únicamente con agua. El nivel recomendado de aplicación es por lo tanto pulverizar las plantas con una preparación en bruto de la proteína de *Lupinus* que contenga 200 µg de proteína/ml.

Ejemplo 9.- Efecto de pulverizar la proteína extraída de *Lupinus* sobre plantas de vid infectadas con *Uncinula necator* (el agente fúngico causante del mildiú pulverulento, económicamente la enfermedad más importante de los viñedos a nivel mundial)

Se preparó un extracto en bruto de *Lupinus* que contenía 200 µg de la proteína de *Lupinus* por mil. Las plantas de vid infectadas con *Uncinula necator* y mantenidas bajo condiciones de invernadero se pulverizaron con el extracto o con agua (control). Veinticuatro horas después de la aplicación, las plantas pulverizadas se observaron con relación al control, las plantas pulverizadas con la proteína de *Lupinus* presentaron un vigor más alto y revelaron la aparición de nuevos brotes. Esta situación se mantuvo durante por lo menos una semana, después de lo cual las plantas, previamente debilitadas por la presencia del hongo, eran exuberantes y con muchas hojas nuevas sin ningún síntoma de la enfermedad.

Ejemplo 10.- Determinación de las concentraciones óptimas de calcio y magnesio requeridas para la preparación de un concentrado de proteína de *Lupinus* tipo tofú

- 5 La composición de aminoácidos muy equilibrada de la proteína de *Lupinus*, así como su excelente digestibilidad (la proteína es fácilmente hidrolizada en sus aminoácidos constitutivos por la acción de las proteasas del tracto digestivo humano) resaltan el gran potencial nutritivo del concentrado de proteínas de *Lupinus* preparado después de precipitar con calcio + magnesio 5 mM las globulinas presentes en una preparación en bruto de la proteína de *Lupinus* (véase la Figura 7).

Referencias

- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffman, N.L. y Woo, S.C. (1983). *Expression of bacterial genes in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **80**, 4801-4807.
- 10 Ferreira, R.B., Franco, E. y Teixeira, A.R. (1999). *Calcium- and magnesium- dependent aggregation of legume seed storage proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3009-3015.
- Ferreira, R.B., Freitas, R.L. y Teixeira, A.R. (2003). *Self-aggregation of legume seed storage proteins inside the protein storage vacuoles is electrostatic in nature, rather than lectin-mediated. FEBS Letters*, **534**, 106-110.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA
 DE SEIXAS BOAVIDA FERREIRA, Ricardo Manuel
 VALADAS DA SILVA MONTEIRO, Sara Alexandra
 NASCIMENTO TEIXEIRA, Artur Ricardo
 BORGES LOUREIRO, Virgílio

10 <120> Proteína extraída de plantas del género *Lupinus* o producida en forma recombinante, secuencia de nucleótidos que la codifica y su uso en nutrición animal, como promotor del crecimiento vegetal y en la lucha contra hongos patógenos

<130> PPI 34874/06

<150> PT 103322

<151> 21-07-2005

15 <150> PT 103511
 <151> 28-06-2006

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

20 <211> 519

<212> DNA

<213> *Lupinus*

<400> 1

```

cgtagacaaa ggaaccctta tcacttcagc tctcaaagat tccaaactct ttacaaaaat      60
aggaatggca aatccgtgt gctcgagagg tttgaccaa gaaccaatag acttgagaat      120
ctccaaaact accgcattgt tgagttccaa tcaaaaccta aactctcat tctccctaaa      180
cactctgatg ctgactacgt cctcgttgta ctcaatggta gagccacaat cacgatagta      240
aaccctgata gaagacaagc atataacctt gagtatggcg atgctctcag aatcccagct      300
ggctcaactt catatatcct taaccgggat gacaaccaga agcttagagt agtcaagctc      360
gcaataccca tcaacaatcc tggctacttt tatgatttct atccatcgag tactaaagac      420
caacaatcct acttcagtgg cttcagcagg aacactttag aggccacctt caatactcgt      480
tatgaagaga tacaaggat tatttttaggg aatgaggat      519

```

25 <210> 2
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> *Lupinus*

<400> 2

Arg Arg Gln Arg Asn Pro Tyr His Phe Ser Ser Gln Arg Phe Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Lys Asn Arg Asn Gly Lys Ile Arg Val Leu Glu Arg Phe Asp
 20 25 30

Gln Arg Thr Asn Arg Leu Glu Asn Leu Gln Asn Tyr Arg Ile Val Glu
 35 40 45

Phe Gln Ser Lys Pro Asn Thr Leu Ile Leu Pro Lys His Ser Asp Ala
 50 55 60

Asp Tyr Val Leu Val Val Leu Asn Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ile Val
 65 70 75 80

Asn Pro Asp Arg Arg Gln Ala Tyr Asn Leu Glu Tyr Gly Asp Ala Leu
 85 90 95

Arg Ile Pro Ala Gly Ser Thr Ser Tyr Ile Leu Asn Pro Asp Asp Asn
 100 105 110

Gln Lys Leu Arg Val Val Lys Leu Ala Ile Pro Ile Asn Asn Pro Gly
 115 120 125

Tyr Phe Tyr Asp Phe Tyr Pro Ser Ser Thr Lys Asp Gln Gln Ser Tyr
 130 135 140

Phe Ser Gly Phe Ser Arg Asn Thr Leu Glu Ala Thr Phe Asn Thr Arg
 145 150 155 160

Tyr Glu Glu Ile Gln Arg Ile Ile Leu Gly Asn Glu Asp
 165 170

5

REIVINDICACIONES

1. El uso de una proteína de la secuencia:

RRQRNPYHFS SQRFQTLYKN RNGKIRVLER FDQRTNRLN LQNYRIVEFQ
SKPNTLILPK HSDADYVLVV LNGRATITIV NPDRRQAYNL EYGDALRIPA
GSTSYILNPD DNQKLRVVKL AIPINNPGYF YDFYPSSTKD QQSYFSGFSR
NTLEATFNTR YEEIQRILG NED

en agricultura como un agente anti-fúngico o anti-oomicetos en el cual dicha proteína se aplica a la planta.

5 2.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína ha sido glicosilada, fosforilada, alquilada, y/o prenilada.

10 3.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha proteína esta en la forma de una formulación, preparación o un extracto en bruto o parcialmente purificado de una planta de tipo natural o genéticamente modificada, o de un cultivo de células transformadas procedentes de una planta, animal o microorganismo.

4.- El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha proteína está en la forma de un extracto crudo de una planta del género *Lupinus*.

5.- El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho extracto es de cotiledones de *Lupinus*.

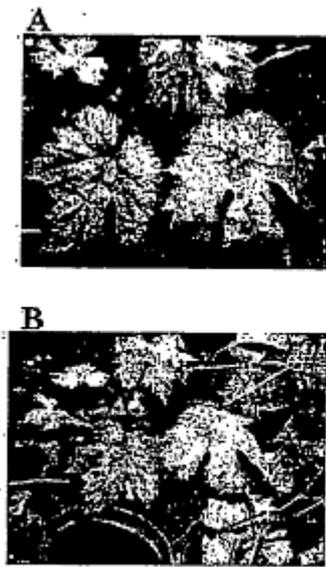


Fig. 1

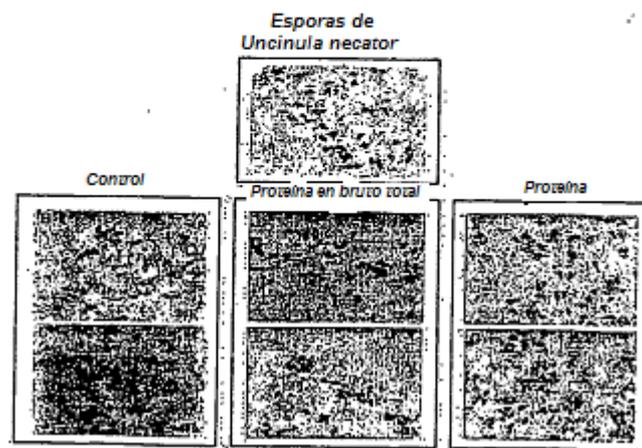


Fig. 2

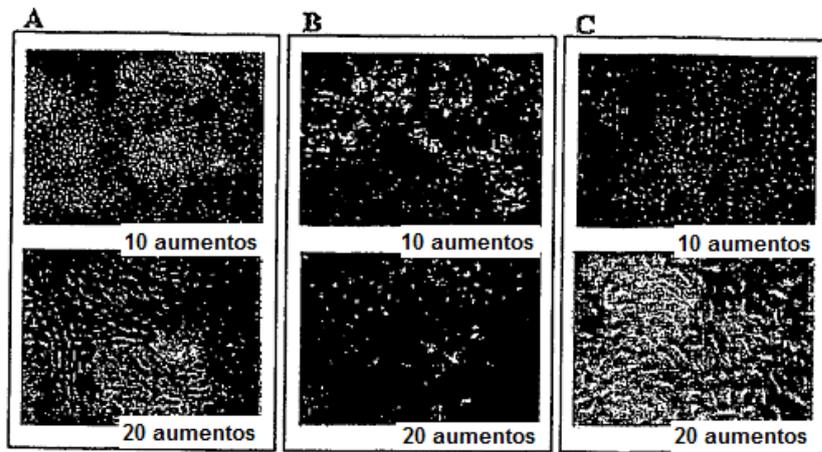


Fig. 3

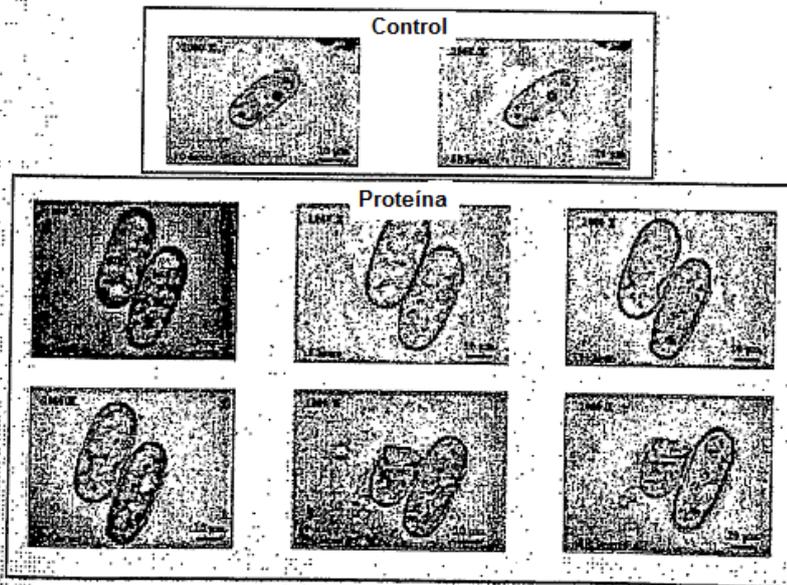


Fig. 4



Fig. 5

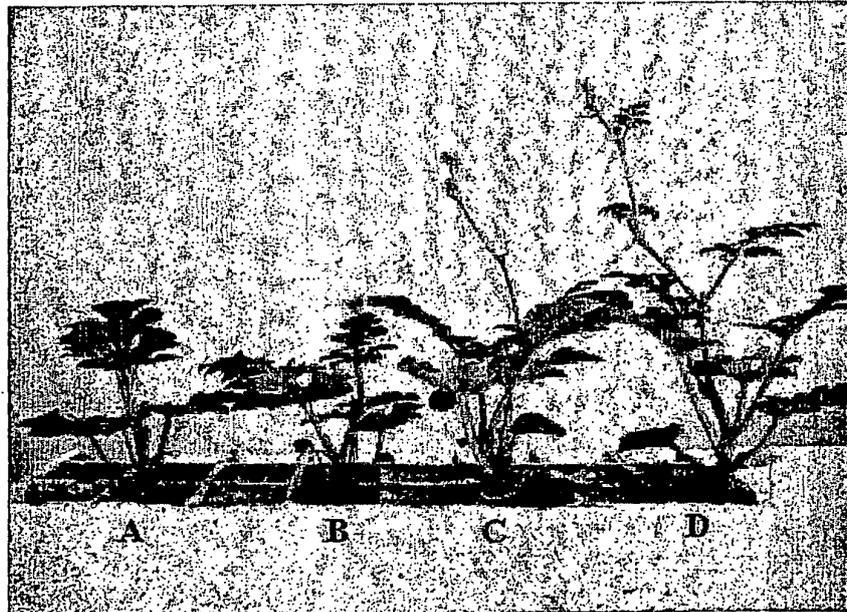


Fig. 6

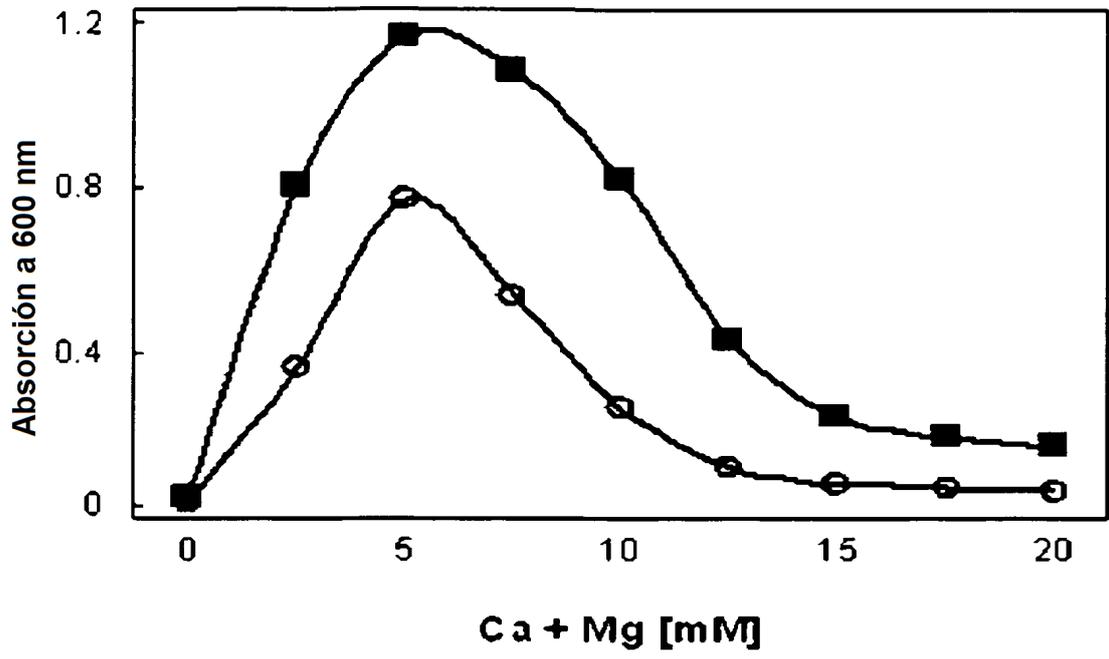


Fig. 7