

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 970**

51 Int. Cl.:

A01N 37/44 (2006.01)

A01N 65/20 (2009.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2011 PCT/EP2011/067828**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12049217**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2011 E 11767734 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2627177**

54 Título: **Uso de agente quelante y compuestos peptídicos antimicrobianos**

30 Prioridad:

13.10.2010 GB 201017282
12.10.2010 PT 10533210

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2017

73 Titular/es:

CONSUMO EM VERDE - BIOTECNOLOGIA DAS PLANTAS, S.A. (100.0%)
Parque Tecnológico de Cantanhede Núcleo 04
Lote 2
3060-197 Cantanhede, PT

72 Inventor/es:

CARREIRA, ALEXANDRA MANUELA LOURENÇO;
VALADAS DA SILVA MONTEIRO, SARA ALEXANDRA y
DE SEIXAS BOAVIDA FERREIRA, RICARDO MANUEL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 600 970 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

Uso de agente quelante y compuestos peptídicos antimicrobianos

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de agentes antimicrobianos que se dirigen a patógenos de plantas.

Introducción

10 El control de patógenos de plantas y la protección de cultivos es un grave problema mundial que se está convirtiendo en una creciente preocupación con los recientes aumentos de la población mundial y las escaseces de alimentos asociadas. Además, las modernas prácticas agrícolas en relación con la cosecha y el almacenamiento tienen a proporcionar buenas condiciones para el crecimiento de patógenos.

15 El uso de pesticidas químicos ha sido la estrategia estándar para el control de plagas. Sin embargo, muchos pesticidas usados actualmente presentan varias desventajas graves. Por ejemplo, muchos tienen un impacto adverso sobre el medio ambiente y muchos tienen eficacia baja o decreciente. Son particularmente preocupantes la baja potencia y/o el estrecho espectro de actividad de algunos compuestos, junto con el desarrollo de resistencia de patógenos.

Entre los objetivos de la presente invención está intentar una solución a estos problemas, y específicamente, por ejemplo, proporcionar un medio para mejorar la actividad de agentes antimicrobianos que son eficaces microorganismos patógenos de plantas.

25 Se reconoce la siguiente técnica anterior:

30 John M Wells et al: "In vitro inhibition of Soft-Rotting Bacteria by EDTA and Nisin and in vivo Response on Inoculated Fresh Cut Carrots", Plant Disease, 1 de enero de 1998, páginas 491-495. Este documento desvela que una composición que comprende tetraacetato de etilendiamina (EDTA) y el agente antimicrobiano polipeptídico nisina inhibía las bacterias de podredumbre blanda pectolíticas *Cytophagae johnsonae*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas viridae*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* y *Erwinia chrysanthemi* en un ensayo *in vitro* donde el calentamiento incrementaba el efecto antimicrobiano.

35 Ferreira et al: "The structure of Lupinus seed storage proteins. Recent developments", Current Topics in Plant Biology, Trivandrum: Research Trends, India, vol. 4, 1 de enero de 2003, páginas 139-150. Este documento desvela que el polipéptido de 20 kDa que es el producto de descomposición β -conglutina de *Lupinus* especie muestra una serie de actividades bioquímicas y biológicas, concretamente potentes efectos antifúngicos.

40 El documento WO 2007/010459 se refiere a la extracción de proteínas de semillas, cotiledones o plántulas del género *Lupinus* así como a la manera de producirlas en forma recombinante y de expresarlas en plantas modificadas genéticamente.

45 Monteiro et al: "Chapter 29: Testing Blad, a potent antifungal protein", 30 de noviembre de 2007, Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises. 2ª Edición, CRC Press, Boca Raton, Taylor & Franics, páginas 323-328. Este documento desvela que cotiledones de *Lupinus albus* se congelaron en nitrógeno líquido, se trituraron y extrajeron con una solución tampón que comprendía tampón Tris-HCl, cloruro sódico, tetraacetato de etilendiamina y bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacetato de etilenglicol. La solución se centrifugó a continuación y se desaló en una columna de desalación PD-10 de GE Healthcare. El extracto desalado que contenía Blad se usó para el ensayo antifúngico. Se determinó el efecto antifúngico sobre la germinación conidial y sobre el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*.

Sumario de la invención

55 La invención se expone en los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

60 La figura 1 muestra la secuencia codificante del precursor de β -conglutina de *Lupinus albus* (SEQ ID NO: 1); y La figura 2 muestra el fragmento interno de la secuencia codificante del precursor de β -conglutina que corresponde a Blad (SEQ ID NO: 3).

Descripción detallada de la invención

65 Los inventores han descubierto que, cuando se usa una combinación de un agente quelante y un agente antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas, dicha combinación es particularmente

eficaz para inhibir el crecimiento de y/o destruir un microorganismo patógeno de plantas. En un aspecto, por lo tanto, los inventores proporcionan una composición que comprende, o que consiste esencialmente en, un agente quelante y un agente antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas. Una composición que comprende un agente quelante y un agente antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas también puede ser una formulación que comprende otro compuesto o compuestos añadidos a la composición por el experto en la materia.

Agentes antimicrobianos

El microorganismo es preferentemente una bacteria (Gram-positiva o Gram-negativa) o un hongo, preferentemente un hongo (que puede ser una levadura o un moho). El agente antimicrobiano comprende (o consiste esencialmente en) un polipéptido, tal como una proteína antifúngica. Los ejemplos adecuados de proteínas antifúngicas incluyen quitinasas, proteínas de unión a quitina, quitosanasas, β -1,3-glucanasas, y β -N-acetil-D-glucosaminidasas. A continuación se proporcionan ejemplos particulares de microorganismos a los que puede dirigirse el agente antimicrobiano.

Polipéptido Blad

El agente antimicrobiano comprende (o consiste esencialmente en) un polipéptido, dicho polipéptido comprende (o consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo.

Blad ("banda de *Lupinus albus* doce" - banda de *L. albus* dulce) fue el nombre dado a un producto de descomposición estable e intermedio de β -conglutina, la principal proteína de almacenamiento presente en las semillas del género *Lupinus*. Se caracterizó como un polipéptido de 20 kD, compuesto por 173 residuos de aminoácidos, y codificado por un fragmento interno (519 nucleótidos, depositado en el GenBank con el número de entrada ABB13526) del gen que codifica el precursor de β -conglutina de *Lupinus* (1791 nucleótidos, publicado en el GenBank, con el número de entrada AAS97865). Cuando se usan cebadores que codifican secuencias terminales de Blad para amplificar una secuencia de ADN genómico de *Lupinus*, se obtienen un producto de ~620 pb, lo que indica la presencia de un intrón en el fragmento génico que codifica Blad. Blad de origen natural es el componente principal de un glucooligómero de 210 kD que se acumula exclusivamente (después de proteólisis limitada intensiva de β -conglutina) en los cotiledones de *Lupinus* especie, entre los días 4 y 12 después del inicio de la germinación. Aunque dicho oligómero está glucosilado, Blad de origen natural no está glucosilada. El glucooligómero que contiene Blad está compuesto por varios polipéptidos, mostrando los mayores, masas moleculares de 14, 17, 20, 32, 36, 48 y 50 kD. El polipéptido de 20 kD, Blad, es con mucho el polipéptido más abundante dentro del oligómero y parece ser el único con actividad lectina. Blad de origen natural constituye aproximadamente el 80 % de la proteína cotiledonaria total en plántulas de 8 días.

La secuencia que codifica el precursor de β -conglutina de *L. albus* (SEQ ID NO: 1) se da en la figura 1. La secuencia codificante de la subunidad parental de β -conglutina está ubicada en los residuos 70 a 1668. La subunidad parental de β -conglutina de 533 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) es:

```

MGKMRVRFPTLVVLVGLIVFLMAVSIIGIAYGEKDVLSHERPEEREQE EWQPRRQR
PQSRREEREQE QEGSPSYPRRQSGYERRQYHERSEQREEREQEQQGSPSYSRR
QRNPYHFSSQRFQTLTKNRNGKIRVLERFDQRTNRLENLQNYRIVEFQSKPNTLI
LPKHSADADYVLVVLNGRATITIVNPDRRQAYNLEYGDALRIPAGSTSYILNPDDN
QKLRVVKLAI PINNPGYFYDFYPSSTKDQOSYFSGFSRNTLEATFNTRYEEIQR I
ILGNEDEQEYEEQRRGQEQSDQDEGVIVIVSKKQIQKLTKHAQSSSGKDKPSDSG
PFNLSNEPIYSNKYGNFYEITPDRNPQVQDLNISLTYIKINEGALLLPHYNSKA
IYVVVVDEGEGNYELVGIIRDQORQDEQEEKEEEVIRYSARLSEGDI FVI PAGYP
ISINASSNLRLLLGFGINADENQRNFLAGSKDNVIRQLDRAVNELTFPGSAEDIER
LIKNOQQSYFANGQPQQQQQQQSEKEGRRGRGSSLPF

```

El fragmento interno de la secuencia codificante del precursor de β -conglutina que corresponde a Blad (SEQ ID NO: 3) se da en la figura 2. El polipéptido Blad (SEQ ID NO: 4) es:

```

RRQRNPYHFSSQRFQTLTKNRNGKIRVLERFDQRTNRLENLQNYRIVEFQSKPNT
LILPKHSADADYVLVVLNGRATITIVNPDRRQAYNLEYGDALRIPAGSTSYILNPD
DNQKLRVVKLAI PINNPGYFYDFYPSSTKDQOSYFSGFSRNTLEATFNTRYEEIQ
RIILGNED

```

Por lo tanto, el agente antimicrobiano comprende (o consiste esencialmente en) un polipéptido que comprende (o consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo, dicho agente comprende (o consiste

esencialmente en) una secuencia polipeptídica que comprende (o que consiste esencialmente en) la SEQ ID NO: 4 o una variante activa de la misma.

5 Una variante activa de Blad es una variante de Blad que conserva la capacidad de actuar como antimicrobiano (es decir tiene actividad antimicrobiana - véase a continuación para una descripción del nivel de dicha actividad y cómo medirla). "Una variante activa de Blad" incluye dentro de su alcance un fragmento de SEQ ID NO: 4. Un fragmento de SEQ ID NO: 4 tiene una longitud de al menos 100 residuos de aminoácidos, tal como al menos 100, 120, 140, 160 o 173 residuos de aminoácidos.

10 "Una variante activa de Blad" también incluye dentro de su alcance una secuencia polipeptídica que tiene homología con la SEQ ID NO: 4, tal como al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, preferentemente al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, preferentemente al menos el 97 %, y de la forma más preferente al menos el 99 % de identidad, por ejemplo en la secuencia completa o en una región de al menos 100, preferentemente al menos 120, preferentemente al menos 140, y de la forma más preferente al menos 160 o más residuos de aminoácidos contiguos. Métodos de medición de homología de proteínas son bien conocidos en la técnica y será entendido por los expertos en la materia que, en el presente contexto, la homología se calcula tomando como base la identidad de aminoácidos (algunas veces denominada "homología dura").

20 La variante de Blad activa homóloga normalmente difiere de la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO: 4 por sustitución, inserción o deleción, por ejemplo de 1, 2, 3, 4, 5 a 8 o más sustituciones, deleciones o inserciones. Las sustituciones son preferentemente "conservativas", es decir que un aminoácido puede sustituirse por un aminoácido similar, con lo que aminoácidos similares comparten uno de los siguientes grupos: residuos aromáticos (F/H/W/Y), residuos alifáticos no polares (G/A/P/I/L/V), alifáticos polares no cargados (C/S/T/M/N/Q) y alifáticos polares cargados (D/E/K/R). Los grupos preferidos comprenden: G/A/P; I/L/V; C/S/T/M; N/Q; D/E; y K/R.

25 Un polipéptido que comprende Blad o una variante activa del mismo (tal como se ha descrito anteriormente) puede consistir en Blad o una variante activa del mismo con cualquier número de residuos de aminoácidos añadidos al extremo N y/o al extremo C, siempre que el polipéptido conserve actividad antimicrobiana (de nuevo, véase a continuación para una descripción del nivel de dicha actividad y cómo medirla). Preferentemente, no más de 300 residuos de aminoácidos se añaden a cualquiera o ambos extremos de Blad o una variante activa del mismo, más preferentemente no más de 200 residuos de aminoácidos, preferentemente no más de 150 residuos de aminoácidos, preferentemente no más de 100 residuos de aminoácidos, preferentemente no más de 80, 60 o 40 residuos de aminoácidos, de la forma más preferente no más de 20 residuos de aminoácidos.

35 Un polipéptido que comprende (o que consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo (tal como se ha descrito anteriormente) puede utilizarse en la invención en forma de una forma purificada (por ejemplo extraída de una fuente vegetal, animal o microbiana) o aislada, y/o puede ser recombinante. La producción de una forma recombinante permite la producción de variantes activas de Blad.

40 Métodos de purificación de Blad de origen natural ya se han descrito en la técnica (por ejemplo Ramos et al (1997) Planta 203(1): 26-34 y Monteiro et al (2010) PLoS ONE 5(1): e8542). Una fuente adecuada de Blad de origen natural es una planta del género *Lupinus*, tal como *Lupinus albus*, preferentemente un cotiledón de dicha planta, preferentemente cosechado entre aproximadamente 4 y aproximadamente 14 días después del comienzo de la germinación, más preferentemente cosechado de 6 a 12 días después del comienzo de la germinación (tales como 8 días después del comienzo de la germinación). En la técnica se desvelan métodos para una extracción de proteínas totales que conduce a un extracto impuro que comprende Blad, y para una purificación de proteínas de dicho extracto que conduce a un extracto parcialmente purificado que, por ejemplo, comprende el glucooligómero que contiene Blad, que comprende Blad.

50 Para aislar el propio Blad, se puede usar a continuación SDS-PAGE y/o, preferentemente, (RP)-HPLC de fase inversa en una columna C-18.

55 Una manera alternativa de obtener un extracto parcialmente purificado que comprende el glucooligómero que comprende Blad es utilizar la actividad de unión a quitina de Blad. El glucooligómero se une de manera muy fuerte a una columna de quitina como parte de una purificación por cromatografía de afinidad de quitina, que es eluida con HCl 0,05 N. Los detalles de un ejemplo de este método de purificación son los siguientes:

60 Cotiledones de plantas de altramuz de ocho días de edad se cosecharon y homogeneizaron en Milli-Q más agua (pH ajustado a 8,0), que contenía CaCl₂ 10 mM y MgCl₂ 10 mM. El homogenado se filtró a través de estopilla y se centrifugó a 30.000 g durante 1 h a 4 °C. El sedimento se suspendió posteriormente en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, que contenía el 10 % (p/v) de NaCl, EDTA 10 mM y EGTA 10 mM, se agitó durante 1 h a 4 °C, y se centrifugó a 30.000 g durante 1 h a 4 °C. La fracción de globulina total, contenida en el sobrenadante, se precipitó con sulfato de amonio (561 g/l), se dejó en agitación en frío durante 1 h y se centrifugó a 30.000 g durante 30 min a 4 °C. El sedimento obtenido se disolvió en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, se desaló en columnas PD-10 equilibradas en el mismo tampón y se hizo pasar a través de una columna de cromatografía por afinidad de quitina pre-equilibrada en el mismo tampón. La columna se lavó con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5,

y las proteínas unidas se eluyeron con HCl 0,05 N. Las fracciones eluidas se neutralizaron inmediatamente con Tris 2 M y las fracciones pico se combinaron, se liofilizaron y se analizaron mediante SDS-PAGE.

5 Para la preparación de la columna de quitina, quitina impura se obtuvo de Sigma y se procesó de la siguiente manera: la muestra de quitina se lavó exhaustivamente con Milli-Q más agua, seguida por HCl 0,05 N. A continuación se lavó con carbonato sódico al 1 % (p/v) y a continuación con etanol, hasta que la absorbancia del lavado era menor de 0,05. La quitina se cargó a continuación en una punta de pipeta y se equilibró con tapón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

10 Métodos de producción de proteínas recombinantes se conocen bien en la técnica. Dichos métodos, tal como se aplican en el presente documento, implicarán insertar el polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende Blad o una variante activa del mismo en un vector de expresión adecuado - lo que permite la yuxtaposición de dicho polinucleótido con uno o más promotores (por ejemplo un promotor inducible, tal como T7lac) y con otros polinucleótidos o genes de interés - introducir el vector de expresión en una célula u organismo adecuado (por ejemplo *Escherichia coli*), expresar el polipéptido en la célula u organismo transformado y retirar el polipéptido recombinante expresado de esa célula u organismo. Para ayudar a dicha purificación, el vector de expresión puede construirse de modo que el polinucleótido codifique adicionalmente, por ejemplo, una marca terminal que pueda ayudar en la purificación: por ejemplo, una cola de residuos de histidina para purificación por afinidad. Una vez que el polipéptido recombinante está purificado, la marca de purificación puede retirarse del polipéptido, por ejemplo, mediante escisión proteolítica.

25 En una composición de la invención que comprende un agente antimicrobiano que comprende (o consiste esencialmente en) un polipéptido, dicho polipéptido está preferentemente en forma parcialmente purificada, más preferentemente en forma purificada. Dicho polipéptido está parcialmente purificado cuando está presente en un entorno que carece de uno o más otros polipéptidos con los que está asociado de forma natural y/o está representado por al menos aproximadamente el 10 % de la proteína total presente. Dicho polipéptido está purificado cuando está presente en un entorno que carece de todos, o la mayoría de, otros polipéptidos con los que está asociado de forma natural. Por ejemplo, Blad purificado significa que Blad representa al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de la proteína total en una composición.

35 En una composición de la invención que comprende un agente antimicrobiano, el contenido de proteína de *Lupinus* puede consistir esencialmente en el glucooligómero que contiene Blad que comprende un polipéptido que comprende (o consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo.

Microorganismos patógenos de plantas

40 El microorganismo patógeno de plantas contra el que el agente antimicrobiano es eficaz es cualquier microorganismo capaz de causar una enfermedad sobre o en una planta. Las dianas bacterianas particularmente preferidas incluyen especies patógenas de *Pseudomonas*, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas tolaasii* y *Pseudomonas agarici* (preferentemente *P. syringae*); especies patógenas de *Erwinia*, tales como *Erwinia persicina*, *Pectobacterium carotovorum*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia psidii* y *Erwinia tracheiphila*, y especies patógenas de *Streptomyces* tales como *Streptomyces griseus*.

50 Las dianas fúngicas particularmente preferidas incluyen especies patógenas de *Alternaria*, tales como *Alternaria alternata*, *Alternaria arborescens*, *Alternaria arbusti*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria carotiincultae*, *Alternaria conjuncta*, *Alternaria dauci*, *Alternaria euphorbiicola*, *Alternaria gaisen*, *Alternaria infectoria*, *Alternaria japonica*, *Alternaria petroselini*, *Alternaria selini*, *Alternaria solani* y *Alternaria smyrnii*, especies patógenas de *Fusarium*, tales como *Fusarium oxysporum* y *Fusarium graminearum* (preferentemente *F. oxysporum*); especies patógenas de *Botrytis*, tales como *Botrytis cinerea*; y especies patógenas de *Colletotrichum*, tales como *Colletotrichum actuatum*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum crassipes*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum kahawae*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum nigrum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Colletotrichum pisi* y *Colletotrichum sublineolum*.

Agentes quelantes

60 El agente quelante (también conocido como un quelante, un quelador o un agente secuestrador) es cualquier compuesto que se une a un ion metálico para formar un complejo no covalente y reducir la actividad del ion. Los agentes quelantes adecuados incluyen poliamino carboxilatos, tales como EDTA (ácido etilenediaminotetraacético) y EGTA (ácido etilenglicol bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético). Preferentemente, se usa EDTA como agente quelante, preferentemente a una concentración de al menos 10 µg/ml, al menos 50 µg/ml, o al menos 100 µg/ml, y hasta 500 µg/ml, hasta 1 mg/ml, hasta 5 mg/ml, hasta 10 mg/ml, o hasta 20 mg/ml. Preferentemente, se usa EDTA a 65 una concentración de entre 0,1 mg/ml y 20 mg/ml, más preferentemente entre 1 mg/ml y 20 mg/ml.

Resultados

El agente antimicrobiano, en combinación con el agente quelante, puede usarse para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno de plantas (lo que significa que tiene actividad microbistática) y/o para destruir dicho microorganismo (lo que significa que tiene actividad microbicida). El experto en la materia será capaz de identificar, mediante métodos rutinarios, una dosis y/o concentración adecuada del agente antimicrobiano, a una concentración particular del agente quelante seleccionado, para obtener una inhibición del crecimiento o destrucción particularmente deseada del microorganismo. Preferentemente, la combinación del agente antimicrobiano y el agente quelante es no tóxica para seres humanos o animales.

Preferentemente, cuando una combinación del agente antimicrobiano y el agente quelante (por ejemplo una composición de la invención) se usa como microbistático, la combinación reduce la tasa de crecimiento en un 10 %, más preferentemente en un 50 %, más preferentemente en un 75 %, más preferentemente en un 90 %, más preferentemente en un 95 %, más preferentemente en un 98 %, más preferentemente en un 99 %, y aún más preferentemente en un 99,9 % en comparación con condiciones equivalentes donde la combinación no está presente. De la forma más preferente, la combinación impide cualquier crecimiento del microorganismo.

Preferentemente, cuando se usa una combinación del agente antimicrobiano y el agente quelante (por ejemplo una composición de la invención) como un microbicida, la composición destruye el 10 % de la población del microorganismo, más preferentemente el 50 % de dicha población, más preferentemente el 75 % de dicha población, más preferentemente el 90 % de dicha población, más preferentemente el 95 % de dicha población, más preferentemente el 98 % de dicha población, más preferentemente el 99 % de dicha población, y aún más preferentemente un 99,9 % de dicha población en comparación con condiciones equivalentes donde la combinación no está presente. De la forma más preferente la combinación destruye toda la población del microorganismo.

Cuando se usa para prevenir o inhibir infección de una planta por un microorganismo, dicha combinación se usa preferentemente en una cantidad eficaz, es decir una cantidad que proporciona un nivel de inhibición del crecimiento y/o destrucción de un microorganismo de modo que se consiga un nivel detectable de prevención o inhibición de infección (por ejemplo se consigue un nivel detectable de prevención o inhibición de daños al tejido de la planta), preferentemente en comparación con condiciones equivalentes donde la combinación no está presente.

El antimicrobiano seleccionado comprende un polipéptido que comprende Blad o una variante activa del mismo a continuación, en combinación con un agente quelante (por ejemplo EDTA a cualquiera de las concentraciones descritas anteriormente), concentraciones adecuadas con las que usar dicho polipéptido incluyen al menos 5 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml o al menos 500 µg/ml, y hasta 1 mg/ml, hasta 2,5 mg/ml, hasta 5 mg/ml o hasta 10 mg/ml. Preferentemente la concentración de dicho polipéptido está entre 50 µg/ml y 10 mg/ml, más preferentemente entre 500 µg/ml y 5 mg/ml, y aún más preferentemente entre 1 mg/ml y 5 mg/ml (tal como aproximadamente 2,5 mg/ml).

Por ejemplo, a EDTA 50 mM (es decir aproximadamente 15,8 mg/ml), puede usarse una concentración de Blad de 1 mg/ml o 2,5 mg/ml por ejemplo para inhibir el crecimiento de *B. cinerea* o *F. oxysporum* respectivamente. Éste es un descubrimiento sorprendente, dado que Blad, a su vez, necesita ser usado a aproximadamente 5 mg/ml o 10 mg/ml (respectivamente) para inhibir el crecimiento de estos patógenos. Los descubrimientos de los inventores permiten a) el uso eficaz de agentes antimicrobianos (que son eficaces contra patógenos de plantas) a concentraciones más bajas mediante el uso de un agente quelante o b) eficacia incrementada de agentes antimicrobianos (que son eficaces contra patógenos de plantas) a concentraciones estándar mediante el uso de un agente quelante. Esto permite un uso más económico/eficaz de dichos antimicrobianos para prevenir o tratar la infección de una planta (o parte de la misma) por un microorganismo.

Usos y métodos

Los inventores también proporcionan el uso de una composición de la invención para inhibir el crecimiento de y/o destruir un microorganismo patógeno de plantas en una planta. Con este fin, también proporcionan un método de inhibición del crecimiento de y/o destrucción de un microorganismo patógeno de plantas que comprende administrar a una planta que lo necesita una composición de la invención (por ejemplo una cantidad eficaz de dicha composición).

Los inventores también proporcionan el uso de un agente quelante y un agente antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas para inhibir el crecimiento de y/o destruir un microorganismo patógeno de plantas en una planta. También proporcionan el uso de un agente quelante para incrementar la actividad de un antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas. Con este fin también proporcionan:

- a) un método de inhibición del crecimiento de y/o destrucción de un microorganismo patógeno de plantas que comprende administrar a una planta que lo necesita un agente quelante y un agente antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas (por ejemplo una cantidad eficaz de una combinación de dichos agentes); y

b) un método de incremento de la actividad de un antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas que comprende usar dicho antimicrobiano con un agente quelante.

En estas realizaciones, dicho agente antimicrobiano y dicho agente quelante pueden administrarse a dicha planta como parte de la misma composición o por separado. Si estos dos agentes se administran por separado, entonces la administración puede ser secuencial (con cualquier agente administrándose en primer lugar) o simultánea. La administración a una planta puede conseguirse, por ejemplo, aplicando (por ejemplo pulverizando) los agentes (o la composición que comprende dichos agentes) sobre una planta (o cualquier parte de la misma) o sumergiendo la planta o parte de la misma (por ejemplo, semilla) en una o más soluciones apropiadas.

Cuando se usa un agente para incrementar la actividad de un antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas, dicho agente quelante (y la concentración del mismo) se selecciona preferentemente de modo que la combinación de dicho agente antimicrobiano y dicho agente quelante proporcione un nivel incrementado de inhibición del crecimiento y/o destrucción de un microorganismo patógeno de plantas (por ejemplo de modo que se consiga un nivel incrementado de prevención o inhibición de infección de la planta, por ejemplo se consiga un nivel incrementado de prevención o inhibición de daños al tejido de la planta), preferentemente en comparación con condiciones equivalentes donde el agente quelante no está presente.

En las realizaciones de uso/método de la invención, el agente antimicrobiano y el agente quelante son tal como se han descrito en detalle anteriormente.

La planta que necesita una combinación de un antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas y un agente quelante puede ser cualquier planta que corra el riesgo de adquirir una infección o que tenga una infección, en la que dicha infección está causada por un microorganismo patógeno de plantas. Preferentemente, la planta es una planta de cultivo (por ejemplo cualquier planta que es cultivada para ser cosechada para proporcionar alimentos, forraje para ganado, combustible, fibra, o cualquier otro producto valioso comercialmente). Preferentemente, dicha planta de cultivo es una planta de cultivo alimentario, tal como una planta que proporciona un azúcar (por ejemplo remolacha azucarera, caña de azúcar), una fruta (incluyendo un fruto seco), una verdura o una semilla. Plantas particulares que proporcionan semillas incluyen cereales (por ejemplo maíz, trigo, cebada, sorgo, mijo, arroz, avena y centeno) y legumbres (por ejemplo alubias, guisantes y lentejas).

Los inventores también proporcionan el uso de una composición que comprende (o que consiste esencialmente en) un polipéptido antimicrobiano que comprende (o que consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo para destruir, o inhibir el crecimiento de, una bacteria patógena de plantas en una planta. Con este fin, los inventores proporcionan además un método de destrucción, o inhibición del crecimiento de, una bacteria patógena de plantas en una planta, comprendiendo dicho método administrar a dicha planta una composición que comprende (o que consiste esencialmente en) una cantidad eficaz de un polipéptido antimicrobiano que comprende (o que consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo. Opcionalmente, el polipéptido antimicrobiano que comprende (o que consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo puede usarse en forma aislada.

En realizaciones preferidas, dicha composición se aplica a una planta que lo necesita. La planta que necesita dicha composición puede ser cualquier planta que corra el riesgo de adquirir una infección o que tenga una infección, en la que dicha infección es causada por una bacteria patógena de plantas. Las plantas preferidas son tal como se ha descrito anteriormente. Los significados de "destruir/inhibir el crecimiento de una bacteria", y "cantidad eficaz", son tal como se ha descrito anteriormente en relación con la combinación de agente antimicrobiano y agente quelante.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos **BLAD** indica el glucooligómero que contiene Blad de origen natural que comprende el polipéptido Blad de 20 kD, purificado según Ramos et al (1997) Planta 203(1): 26-34: véase las partes "Material vegetal y condiciones de crecimiento" y "Purificación de proteínas" de la sección de Materiales y métodos de ese documento.

Definiciones:

CIM - Concentración inhibitoria mínima: la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo.

CFM/CBM - Concentración fungicida/bactericida mínima (o concentración letal mínima): la concentración más baja de un agente antimicrobiano necesaria para destruir el 99,9 % del inóculo inicial después de 24 h en un conjunto de condiciones estandarizadas.

Ejemplo 1 - Actividad bactericida de BLAD y efecto sinérgico de EDTA sobre ella.

A. Se descubrió que BLAD es bacteriostático a 100 µg/ml y bactericida a 250 µg/ml contra *P. aeruginosa*. Contra *P. aeruginosa* BLAD a 50 µg/ml o EDTA a 1 mg/ml inhibe el crecimiento (es decir ambos son bacteriostáticos) pero una combinación de los dos es bactericida.

B. Contra *Erwinia pircicina* BLAD tiene una CIM de 32 µg/ml y EDTA tiene una CIM de 15 mM. Sin embargo, en presencia de cantidades sub-inhedoras de EDTA (0,75 mM) la CIM para BLAD se rebaja a 16 µg/ml.

5 C. Contra *Streptomyces griseus* BLAD tiene una CIM de 1024 µg/ml y EDTA tiene una CIM de 16 mM. Sin embargo, en presencia de cantidades sub-inhedoras de EDTA (8 mM) la CIM para BLAD se rebaja a 256 µg/ml.

Ejemplo 2 - Efecto sinérgico de EDTA sobre la actividad fungicida de BLAD.

10 Datos de inhibición del halo para BLAD con y sin EDTA contra *Botrytis cinerea* en agar dextrosa de patata (PDA) a 1,2 % p/v de agar (incubación 3 días a 25 °C):

Agente/agentes	Diámetro de inhibición del halo (mm)			Diámetro promedio de inhibición del halo (mm)
Blad (200 µg)	21	21	22	21
Blad (100 µg)	16	16	15	16
Blad (50 µg)	0	0	0	0
Blad (20 µg)	0	0	0	0
EDTA (50 mM)	0	0	0	0
Blad (200 µg) + EDTA (50 mM)	23	24	25	24
Blad (100 µg) + EDTA (50 mM)	19	19	18	19
Blad (50 µg) + EDTA (50 mM)	13	15	14	14
Blad (20 µg) + EDTA (50 mM)	10	12	12	11

15 El crecimiento de *B. cinerea* se inhibió con 200 µg y 100 µg de BLAD. Esta inhibición se potenció con la adición de EDTA 50 mM (aproximadamente 15,8 mg/ml).

No se observó inhibición del crecimiento usando BLAD en solitario a 20 µg o 50 µg o usando EDTA en solitario a 50 mM. Sin embargo, se observó inhibición cuando BLAD a cualquier concentración se combinó con EDTA 50 mM.

20 Datos de inhibición del halo para BLAD con y sin EDTA contra *Fusarium oxysporum* en agar dextrosa de patata (PDA) al 1,2 % p/v de agar (incubación 3 días a 25 °C):

Agente/agentes	Diámetro de inhibición del halo (mm)			Diámetro promedio de inhibición del halo (mm)
Blad (200 µg)	25	22	22	23
Blad (100 µg)	0	0	0	0
Blad (50 µg)	0	0	0	0
Blad (20 µg)	0	0	0	0
EDTA (50 mM)	0	0	0	0
Blad (200 µg) + EDTA (50 mM)	28	27	30	28
Blad (100 µg) + EDTA (50 mM)	22	21	26	23
Blad (50 µg) + EDTA (50 mM)	24	20	15	20
Blad (10 µg) + EDTA (50 mM)	0	0	0	0

25 El crecimiento de *F. oxysporum* se inhibió con 200 µg de BLAD. Esta inhibición se potenció con la adición de EDTA 50 mM.

No se observó inhibición del crecimiento usando BLAD en solitario a 20 µg, 50 µg o 100 µg, o usando EDTA en solitario a 50 mM. Sin embargo, se observó inhibición cuando 50 µg o 100 µg de BLAD se combinaron con EDTA 50 mM.

30 Ejemplo 2 - Efecto sinérgico de EDTA sobre la actividad fungicida de BLAD.

Datos de inhibición del halo para BLAD con y sin EDTA contra *Botrytis cinerea* en agar dextrosa de patata (PDA) al 1,2 % p/v de agar (incubación 3 días a 25 °C):

Agente/agentes	Diámetro de inhibición del halo (mm)			Diámetro promedio de inhibición del halo (mm)
Blad (200 µg)	21	21	22	21
Blad (100 µg)	16	16	15	16
Blad (50 µg)	0	0	0	0
Blad (20 µg)	0	0	0	0
EDTA (50 mM)	0	0	0	0

Agente/agentes	Diámetro de inhibición del halo (mm)			Diámetro promedio de inhibición del halo (mm)
Blad (200 µg) + EDTA (50 mM)	23	24	25	24
Blad (100 µg) + EDTA (50 mM)	19	19	18	19
Blad (50 µg) + EDTA (50 mM)	13	15	14	14
Blad (20 µg) + EDTA (50 mM)	10	12	12	11

El crecimiento de *B. cinerea* se inhibió con 200 µg y 100 µg of BLAD. Esta inhibición se potenció con la adición de EDTA 50 mM (aproximadamente 15,8 mg/ml).

- 5 No se observó inhibición del crecimiento usando BLAD en solitario a 20 µg o 50 µg o usando EDTA en solitario a 50 mM. Sin embargo, se observó inhibición cuando BLAD a cualquier concentración se combinó con EDTA 50 mM.

Datos de inhibición del halo para BLAD con y sin EDTA contra *Fusarium oxysporum* en agar dextrosa de patata (PDA) al 1,2 % p/v de agar (incubación 3 días a 25 °C):

10

Agente/agentes	Diámetro de inhibición del halo (mm)			Diámetro promedio de inhibición del halo (mm)
Blad (200 µg)	25	22	22	23
Blad (100 µg)	0	0	0	0
Blad (50 µg)	0	0	0	0
Blad (20 µg)	0	0	0	0
EDTA (50 mM)	0	0	0	0
Blad (200 + EDTA (50 mM)	28	27	30	28
Blad (100 µg) + EDTA (50 mM)	22	21	26	23
Blad (50 µg) + EDTA (50 mM)	24	20	15	20
Blad (10 µg) + EDTA (50 mM)	0	0	0	0

El crecimiento de *F. oxysporum* se inhibió con 200 µg de BLAD. Esta inhibición se potenció con la adición de EDTA 50 mM.

- 15 No se observó inhibición del crecimiento usando BLAD en solitario a 20 µg, 50 µg o 100 µg, o usando EDTA en solitario a 50 mM. Sin embargo, se observó inhibición cuando 50 µg o 100 µg de BLAD se combinaron con EDTA 50 mM.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> CEV - Biotechnologia das Planta S.A. et al
- <120> Agentes para uso con antimicrobianos
- 25 <130> P11337 WO
- <150> PT105332
- <151> 12-10-2010
- 30 <150> GB1017282.3
- <151> 13-10-2010
- <160> 4
- 35 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1791
- <212> ADN
- 40 <213> *Lupinus albus*
- <400> 1

ES 2 600 970 T3

gatggcgatg aatgaacact gcgtttgctg gctttgatga aaatcgagtg caacctaata	60
taatcaaata tgggtaagat gagagtgagg tttccaacgt tagtgttggt actaggaata	120
gtattcctca tggcagtgtc aattggtatt gcttatggag aaaaagatgt gctaaagagt	180
catgagaggc ctgaggaaaag agaacaagag gagtggcaac ctaggagaca acgacctcaa	240
agtagaaggg aagagagaga gcaagagcaa gagcaggggt ctccctcata cccacgcagg	300
cagagtgggt atgagaggag acaataccat gagaggagtg agcagaggga agagagagag	360
caagaacaac aacaaggttc tccctcatal tcacgtagac aaaggaaccc ttatcacttc	420
agctctcaaa gattccaaac tctttacaaa aataggaatg gcaaatccg tgtgctcgag	480
aggtttgacc aaagaaccaa tagacttgag aatctccaaa actaccgcat tgttgagttc	540
caatcaaac ctaacactct cattctccct aaacactctg atgctgacta cgtcctcgtt	600
gtactcaatg gtagagccac aatcacgata gtaaaccctg atagaagaca agcatataac	660
cttgagtatg gcgatgctct cagaatccca gctggctcaa cttcatatat ccttaaccgg	720
gatgacaacc agaagcttag agtagtcaag ctcgcaatac ccatcaaaa tcctggctac	780
ttttatgatt tctatccatc gagtactaaa gaccaacaat cctacttcag tggcttcagc	840
aggaacactt tagaggccac cttcaatact cgttatgaag agatacaaa gattatttta	900
gggaatgagg atgagcaaga atatgaggaa caaaggcgtg ggcaagagca gagcgaccaa	960

gacgaggggg tgatagtgat agtttcaaag aaacagatcc aaaaattgac aaaacacgct 1020
 caatcttcat caggaaaaga caaacctct gattctggcc ctttcaactt gagaagcaat 1080
 gagcccatat attcaaacia gtatgggaac ttctatgaaa tcaactccaga tagaaacct 1140
 caagttcagg atttgaatat ctctctcacc tatataaaaa ttaacgaggg agctttgttg 1200
 ttgccacact ataactcaaa ggccatatat gtagtcgtgg ttgatgaagg agaaggaaat 1260
 tatgaactgg taggtattcg agatcaacia cgacaacia agatgagcaaga agagaaagag 1320
 gaagaagtga taaggatatag tgctagatta tcagaagggtg acatttttgt aattccagca 1380
 ggttatcaa tttccatcaa tgcttctca aatcttcgct tgcttggatt tggcatcaat 1440
 gctgatgaaa accagaggaa tttcctcgca ggttctaaag acaatgtgat aaggcagtta 1500
 gatagagcag tgaatgagct cacattcct ggttctgctg aagatattga gagattaatc 1560
 aaaaaccaac aacagtctta ctttgcaaat ggtcagcctc aacaacaaca acaacaacia 1620
 agtgagaagg aggggaaggcg tggaagaagg ggttcatctc ttccattttg agcacttttt 1680
 actaagctgt tttaaaagct actatcatgt aagagctcat agtgagctac tgagagaata 1740
 ataaaactaa agttggacct ttgtactaat aatgttaata aaaaaaaaaa a 1791

<210> 2
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> *Lupinus albus*

5

<400> 2

Met Gly Lys Met Arg Val Arg Phe Pro Thr Leu Val Leu Val Leu Gly
 1 5 10 15
 Ile Val Phe Leu Met Ala Val Ser Ile Gly Ile Ala Tyr Gly Glu Lys
 20 25 30
 Asp Val Leu Lys Ser His Glu Arg Pro Glu Glu Arg Glu Gln Glu Glu
 35 40 45
 Trp Gln Pro Arg Arg Gln Arg Pro Gln Ser Arg Arg Glu Glu Arg Glu
 50 55 60
 Gln Glu Gln Glu Gln Gly Ser Pro Ser Tyr Pro Arg Arg Gln Ser Gly
 65 70 75 80

10

ES 2 600 970 T3

Tyr Glu Arg Arg Gln Tyr His Glu Arg Ser Glu Gln Arg Glu Glu Arg
85 90 95

Glu Gln Glu Gln Gln Gln Gly Ser Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Gln Arg
100 105 110

Asn Pro Tyr His Phe Ser Ser Gln Arg Phe Gln Thr Leu Tyr Lys Asn
115 120 125

Arg Asn Gly Lys Ile Arg Val Leu Glu Arg Phe Asp Gln Arg Thr Asn
130 135 140

Arg Leu Glu Asn Leu Gln Asn Tyr Arg Ile Val Glu Phe Gln Ser Lys
145 150 155 160

Pro Asn Thr Leu Ile Leu Pro Lys His Ser Asp Ala Asp Tyr Val Leu
165 170 175

Val Val Leu Asn Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ile Val Asn Pro Asp Arg
180 185 190

Arg Gln Ala Tyr Asn Leu Glu Tyr Gly Asp Ala Leu Arg Ile Pro Ala
195 200 205

Gly Ser Thr Ser Tyr Ile Leu Asn Pro Asp Asp Asn Gln Lys Leu Arg
210 215 220

Val Val Lys Leu Ala Ile Pro Ile Asn Asn Pro Gly Tyr Phe Tyr Asp
225 230 235 240

Phe Tyr Pro Ser Ser Thr Lys Asp Gln Gln Ser Tyr Phe Ser Gly Phe
245 250 255

Ser Arg Asn Thr Leu Glu Ala Thr Phe Asn Thr Arg Tyr Glu Glu Ile
260 265 270

Gln Arg Ile Ile Leu Gly Asn Glu Asp Glu Gln Glu Tyr Glu Glu Gln
275 280 285

Arg Arg Gly Gln Glu Gln Ser Asp Gln Asp Glu Gly Val Ile Val Ile
290 295 300

ES 2 600 970 T3

Val Ser Lys Lys Gln Ile Gln Lys Leu Thr Lys His Ala Gln Ser Ser
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Asp Lys Pro Ser Asp Ser Gly Pro Phe Asn Leu Arg Ser
 325 330 335
 Asn Glu Pro Ile Tyr Ser Asn Lys Tyr Gly Asn Phe Tyr Glu Ile Thr
 340 345 350
 Pro Asp Arg Asn Pro Gln Val Gln Asp Leu Asn Ile Ser Leu Thr Tyr
 355 360 365
 Ile Lys Ile Asn Glu Gly Ala Leu Leu Leu Pro His Tyr Asn Ser Lys
 370 375 380
 Ala Ile Tyr Val Val Val Val Asp Glu Gly Glu Gly Asn Tyr Glu Leu
 385 390 395 400
 Val Gly Ile Arg Asp Gln Gln Arg Gln Gln Asp Glu Gln Glu Glu Lys
 405 410 415
 Glu Glu Glu Val Ile Arg Tyr Ser Ala Arg Leu Ser Glu Gly Asp Ile
 420 425 430
 Phe Val Ile Pro Ala Gly Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Ala Ser Ser Asn
 435 440 445
 Leu Arg Leu Leu Gly Phe Gly Ile Asn Ala Asp Glu Asn Gln Arg Asn
 450 455 460
 Phe Leu Ala Gly Ser Lys Asp Asn Val Ile Arg Gln Leu Asp Arg Ala
 465 470 475 480
 Val Asn Glu Leu Thr Phe Pro Gly Ser Ala Glu Asp Ile Glu Arg Leu
 485 490 495
 Ile Lys Asn Gln Gln Gln Ser Tyr Phe Ala Asn Gly Gln Pro Gln Gln
 500 505 510
 Gln Gln Gln Gln Gln Ser Glu Lys Glu Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly
 515 520 525

ES 2 600 970 T3

Ser Ser Leu Pro Phe
530

5 <210> 3
<211> 519
<212> ADN
<213> *Lupinus albus*

<400> 3

```

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

10

15 <210> 4
<211> 173
<212> PRT
<213> *Lupinus albus*

<400> 4

```

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
    
```

ES 2 600 970 T3

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un agente quelante y un agente antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas para inhibir el crecimiento de y/o destruir un microorganismo patógeno de plantas en una planta; en el que dicho agente antimicrobiano comprende un polipéptido que comprende la secuencia Blad mostrada en la SEQ ID NO: 4 o una variante activa de la misma que tiene actividad antimicrobiana y que comprende una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de SEQ ID NO: 4 que tiene al menos 100 aminoácidos de longitud.
- 10 2. Uso de un agente quelante para incrementar la actividad de un agente antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas; en el que dicho agente antimicrobiano es como se define en la reivindicación 1.
- 15 3. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que dicho agente quelante y dicho agente antimicrobiano se aplican a una planta que lo necesita.
- 20 4. Un uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho agente antimicrobiano y dicho agente quelante se administran a dicha planta:
a) como parte de la misma composición; o
b) por separado, secuencial o simultáneamente.
- 25 5. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente antimicrobiano es eficaz contra una bacteria u hongo patógeno de plantas.
- 30 6. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente quelante es un poliamino carboxilato.
- 35 7. Un uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el agente quelante es EDTA.
- 40 8. Un método de inhibición del crecimiento de y/o destrucción de un microorganismo patógeno de plantas que comprende administrar a una planta que lo necesita un agente quelante y un agente antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas; en el que dicho agente antimicrobiano es como se define en la reivindicación 1.
- 45 9. Un método de incremento de la actividad de un antimicrobiano que es eficaz contra un microorganismo patógeno de plantas que comprende usar dicho antimicrobiano con un agente quelante; en el que dicho agente antimicrobiano es como se define en la reivindicación 1.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo es una bacteria patógena de plantas.
11. Un uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la bacteria es una especie patógena de uno de los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Streptomyces*.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que el microorganismo es una bacteria patógena de plantas.

Figura 1

```

1 gatggcgatg aatgaacact gcgtttgctg gctttgatga aaatcgagtg caacctaaata
61 taatcaata tgggtaagat gagagtgagg ttccaacgt tagtgttggg actaggaata
121 gtattcctca tggcagtgtc aattggtatt gcttatggag aaaaagatgt gctaaaagat
181 catgagaggg ctgaggaag agaacaagag gagtggcaac ctaggagaca cggacctcaa
241 agtagaaggg aagagagaga gcaagagcaa gagcagggtt ctccctcata cccacgcagg
301 cagagtgggt atgagaggag acaataccat gagaggagtg agcagagggg agagagagag
361 caagaacaac aacaagggtt tcctcatalc tcacgtagac aaaggaaccc ttatcacttc
421 agctctcaaa gatccaac tccttacaaa aataggaatg gcaaaatccg tgtgctcgag
481 aggtttgacc aaagaaccaa tagacttgag aatctccaaa actaccgcat tgttgagtcc
541 caatcaaac ctAACactct cattctccct aaacactctg atgctgacta cgtcctcgtt
601 gtactcaatg gtagagccac aatcacgata gtaaaccctg atagaagaca agcataaac
661 cttgagtatg gcgatgctct cagaatccca gctggctcaa cttcatatat ccttaacccg
721 gatgacaacc agaagcttag agtagtcaag ctgcaatac ccatacaaaa tcctggctac
781 ttttatgatt tctatccatc gagtactaaa gaccaacaat cctacttcag tggcttcagc
841 aggaacactt tagaggccac cttcaatact cgttatgaag agatacaaaa gattatttta
901 gggaaatgag atgagcaaga atatgaggaa caaaggcgtg ggcaagagca gagcgaccaa
961 gacgaggggg tgatagtgat agtttcaaa gatttcaatc aaaaattgac aaaaacagct
1021 caatcttcat caggaaaaga caaacctctt gattctggcc cttcaactt gagaagcaat
1081 gagcccatat attcaaaaa gtatgggaa cttatatgaaa tcaactccaga tagaaaacct
1141 caagttcagg atttgaatat ctctccacc tataaaaaa ttaacgaggg agctttgttg
1201 ttgccacact ataactcaaa ggcataatat gtagtctggt ttgatgaagg agaaggaaa
1261 tatgaaactgg taggtattcg agatcaaaa cgacaacaag atgagcaaga agagaaagag
1321 gaagaagtga taaggatatg tgctagatta tcagaagggtg acatttttgt aattccagca
1381 ggttatccaa tttccatcaa tgcttctcctca aatcttcgct tgcttggatt tggcatcaat
1441 gctgatgaaa accagagggaa tttcctcgca ggttctaag acaatgtgat aaggcagtta
1501 gatagagcag tgaatgagct cacattccct ggttctgctg aagatatgga gagattaatc
1561 aaaaaccaac aacagtctta ctttgcaaat ggtcagcctc aacaacaaca acaacaaca
1621 agtgagaagg agggaaaggc tggaaagagg ggttcatctc ttccattttg agcactttt
1681 actaagctgt tttaaaaagc actatcatgt aagagctcat agtgagctac tgagagaata
1741 ataaaaactaa agttggacct ttgtactaat aatgttaata aaaaaaaaa a

```

Figura 2

```

1  cgtagacaaa ggaaccctta tcacttcagc tctcaagat tccaactct ttacaaaat
61  aggaatggca aaatccgtgt gctcgagagg tttgaccaa gaaccaatag acttgagaat
121 ctccaaaact accgcattgt tgagttccaa tcaaaaacct acaactctcat tctccctaaa
181 cactctgatg ctgactacgt cctcgttgta ctcaatggta gagccacaat cacgatatga
241 aaccctgata gaagacaagc atataacctt gagtatggcg atgctctcag aatcccagct
301 ggctcaactt cataatcct taaccgggat gacaaccaga agcttagagt agtcaagctc
361 gcaataccca tcaacaatcc tggctacttt tatgatttct atccatcgag tactaaagac
421 caacaatcct acttcagtgg cttcagcagg aacacttttag aggccacctt caatactcgt
481 tatgaagaga tacaaggat tattttaggg aatgaggat

```