

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 512**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

**A01N 37/18** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2009 PCT/CU2009/000003**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO2009117975**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2009 E 09723850 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2298922**

54 Título: **Secuencias de ácido nucleico y aminoácidos para el control de agentes patógenos**

30 Prioridad:

**28.03.2008 CU 20080045**

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

**26.06.2017**

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (100.0%)**

**Avenida 31 entre 158 y 190 Cubanacán Playa Ciudad de La Habana 10600, CU**

72 Inventor/es:

**BORRAS HIDALGO, ORLANDO;  
PORTIELES ÁLVAKEZ, ROXANA, CARIDAD;  
PUJOL FERRER, MERARDO;  
ENRÍQUEZ OBREGÓN, GIL , ALBERTO;  
GONZÁLEZ RAMOS, ERNESTO, MANUEL;  
AYRA PARDO, CAMILO y  
BORROTO NORDELO, CARLOS, GUILLERMO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 619 512 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

Secuencias de ácido nucleico y aminoácidos para el control de agentes patógenos.

## 5 Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología agropecuaria, específicamente con el uso de una proteína antipatógena en el control de agentes patógenos. Cuando se aplica la proteína antipatógena, ya sea mediante su expresión en plantas modificadas genéticamente, o como un bioproducto, se obtienen altos niveles de control de enfermedades producidas por agentes patógenos de plantas.

## Estado de la técnica anterior

Las proteínas antipatógenas de plantas se aíslan de hojas, vainas, raíces, tubérculos, tallos, frutos y flores, de cultivos como el rábano, cebolla, alfalfa, ají, papa y soya. Las proteínas antipatógenas se estudiaron a nivel bioquímico y estructural, ellas son péptidos pequeños, de aproximadamente 5 KDa, con 45 a 54 aminoácidos, ricos en cisteínas, altamente básicos, y cargados positivamente. La familia de las proteínas antipatógenas de plantas es diversa con respecto a la composición de aminoácidos, ya que solamente parecen ser conservadas las ocho cisteínas que estabilizan la estructura. Esta característica refleja las diversas actividades biológicas que exhiben las diferentes proteínas antipatógenas de plantas (Broekaert y otros. (1995) *Plant Physiol.* 108:1353-8).

Las proteínas antipatógenas de plantas pueden dividirse en dos grupos, de acuerdo a la estructura de la proteína precursora; en el primer grupo la proteína precursora está compuesta por un péptido señal del retículo endoplásmico y un dominio de proteína madura. Esta proteína entra en las vías secretoras y no tiene señales para los procesos postranscripcionales. En el segundo grupo, la proteína antipatógena se forma por un precursor largo que contiene además del péptido señal y el dominio maduro, un dominio C-terminal de 33 aminoácidos aproximadamente. Hasta la fecha, estas proteínas antipatógenas se encontraron solo en especies de solanáceas (Lay y Anderson (2005) *Curr Protein Pept Sci.* 6:85-101). No todas las proteínas antipatógenas de plantas tienen la misma acción, algunas exhiben una potente actividad *in vitro* contra un amplio espectro de hongos filamentosos, en concentraciones micromolares; otras no inhiben el crecimiento fúngico, pero inhiben la  $\alpha$ -amilasa y la síntesis de proteínas (Colilla y otros (1990) *FEBS Lett.* 270: 191-194).

El modelo Shai-Matsuzaki-Huang explica la actividad de la mayoría de las proteínas antipatógenas, este modelo explica la interacción del péptido con la membrana plasmática seguido por un desplazamiento lipídico, que causa la formación de poros multiméricos dentro de la membrana plasmática debido a la inserción de la proteína cargada positivamente en la membrana celular después que se produce su interacción con los fosfolípidos cargados negativamente de la superficie de la célula diana, estos poros multiméricos constituyen canales iónicos activados por voltaje (Thomma y otros. (2002) *Planta* 216:193-202).

Otro modelo se basa en la teoría de que muchas proteínas antipatógenas ejercen su acción no solo mediante la permeabilización de la membrana citoplasmática sino además, mediante dianas citoplasmáticas, estas proteínas una vez dentro de la célula diana afectan la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y proteínas. Esto sugiere que la habilidad de las proteínas catiónicas para causar permeabilización de la membrana citoplasmática pudiera no ser la causa principal en el mecanismo de acción, sino la vía de búsqueda de una diana intracelular (Thomma y otros. (2003) *Curr Drug Targets Infect Disord.* 3:1-8).

Hasta la fecha, se identificaron y caracterizaron muchos tipos de proteínas antipatógenas, cuyas posibles aplicaciones son diversas, pues la ingeniería genética proporciona una estrategia de resistencia a enfermedades en las plantas a través de herramientas celulares y moleculares (Thomma y otros. (2003) *Curr Drug Targets Infect Disord.* 3:1-8). Se demostró que la expresión constitutiva de proteínas antipatógenas de rábano incrementa la resistencia de plantas de tabaco al patógeno de hojas *Alternaria longipes*, (Terra y otros. (1995) *Plant Cell* 7: 573-588), de igual forma ocurre en las plantas de tomate con *Alternaria solani*. Además, la expresión constitutiva de una proteína antipatógena proporciona una alta resistencia al hongo *Verticillium dahliae* de importancia agronómica en el cultivo de la papa bajo condiciones de campo (Gao y otros. (2000) *Nat. Biotechnol.* 18: 1307-1310).

Por otra parte, las plantas de arroz que expresan los genes de proteínas antipatógenas de las especies *Brassica oleracea* y *B. campestris*, se modificaron para sustituir aminoácidos en diferentes posiciones, y estos genes se introdujeron individualmente en plantas de arroz para la búsqueda de resistencia a *Magnapotha grisea* y *Xanthomonas oryzae*; enfermedades de gran importancia en países subtropicales y tropicales. Estas proteínas antipatógenas confirieron una resistencia eficaz para ambas enfermedades y la modificación de estos genes incrementó la resistencia de amplio espectro en el arroz transgénico (Kawata y otros. (2003) *JARQ* 37: 71 - 76).

La aplicación de las proteínas antipatógenas de plantas como alternativa para reducir la pérdida de cosechas debido al ataque de patógenos constituye una ventaja con respecto a la aplicación de los fungicidas químicos. Primero: las proteínas antipatógenas de plantas se derivan de semillas, raíces y tubérculos, por lo que ellas constituyen sustancias naturales que no son tóxicas a la planta hospedera y tampoco a las personas que consumen los productos de estas

plantas. Segundo: como cualquier otra proteína, las proteínas antipatógenas se degradan rápidamente como las sustancias nativas, y no dejan ningún residuo después que expira su efectividad (Thomma y otros. (2003) Curr Drug Targets Infect Disord. 3:1-8).

5 Las proteínas antipatógenas de plantas pueden usarse además para el desarrollo de medicamentos antifúngicos, pues el control de patógenos eucariotas siempre constituyó uno de los mayores problemas en la medicina, que aumentó en las últimas décadas por el incremento de pacientes inmunodeprimidos debido a enfermedades tales como el SIDA, el cáncer y los trasplantes de órganos, además, del surgimiento de cepas resistentes a múltiples drogas y a la aparición de nuevas especies de hongos filamentosos y de levaduras que se reconocen como patógenos oportunistas (Thomma y otros. (2003) Curr Drug Targets Infect Disord. 3:1-8).

10 Debido a la similitud entre las células de los mamíferos y la de los patógenos, los compuestos antifúngicos deben actuar sobre moléculas que no están o raramente están presente en células de mamíferos, como los componentes de la pared celular y los factores de virulencia, y ellos deben, además, ser productos lo más naturales posible, con un amplio espectro de acción, fáciles de producir y que no induzcan resistencia (Walsh y otros. (2000) Medical Mycology, 38: 335-347). Por otra parte, las membranas celulares fúngicas son dianas atractivas para el desarrollo de estos agentes, porque los componentes de la membrana fúngica, como los esfingolípidos, son diferentes estructuralmente en células de mamíferos. Las proteínas antipatógenas de planta no tienen como diana la biosíntesis de los esfingolípidos, sino que actúan totalmente a la inversa pues sus dianas son sus propios esfingolípidos lo que ocasiona la permeabilización de la membrana fúngica. Esto le proporciona una alta selectividad y por tanto, perspectivas interesantes para el tratamiento de infecciones fúngicas. Algunas proteínas antipatógenas de plantas se encontraron como: Dm-AMP1, Hs-AFP1 y Rs-AFP2 que son activas a concentraciones micromolares contra *Candida albicans*, un patógeno de gran interés clínico en humanos, lo que constituye un ejemplo del potencial de este tipo de proteínas de plantas para el desarrollo de la terapéutica (Thomma y otros. (2003) Curr Drug Targets Infect Disord. 3:1-8).

25 Un problema importante para solucionarse es lograr productos antipatógenicos de origen proteico capaces de controlar eficientemente una gama amplia de bacterias y hongos patógenos, aspecto de mucha importancia en la agricultura y la medicina.

30 Descripción detallada de la invención

Esta descripción contribuye a resolver el problema que se mencionó antes, al proporcionar la secuencia de nucleótidos (Sec. con núm. de ident. 1) y la secuencia de aminoácidos (Sec. con núm. de ident. 6) de una nueva proteína antipatógena que se aisló de *Nicotiana megalosiphon*. La secuencia de nucleótidos de la descripción codifica para una proteína pequeña rica en cisteínas, la que tiene un efecto marcado sobre diversos agentes patógenos.

35 La presente descripción proporciona un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como Sec. con núm. de ident. 1, o codifica para un polipéptido que comprende a) la secuencia de aminoácidos identificada como Sec. con núm. de ident. 6, o b) una secuencia de aminoácidos con al menos un 60 % de identidad con la Sec. con núm. de ident. 6 y que mantiene sus propiedades para controlar la infección de bacterias y hongos fitopatógenos.

40 Un objetivo de la presente descripción es, además, un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende a) la secuencia de aminoácidos identificada como Sec. con núm. de ident. 6, o b) una secuencia de aminoácidos donde uno o diversos residuos de aminoácidos se eliminaron, sustituyeron y añadieron a la secuencia de aminoácidos identificada como Sec. con núm. de ident. 6, la cual mantiene sus propiedades para controlar la infección por agentes patógenos.

45 La invención proporciona, además, un método para incrementar la resistencia a las enfermedades de las plantas que producen los agentes patógenos, mediante la transformación genética de la planta con una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico identificada como Sec. con núm. de ident. 1, que conduce a la expresión constitutiva o inducida de la proteína antipatógena que comprende la Sec. con núm. de ident. 6, en donde dichos agentes patógenos son bacterias u hongos fitopatógenos.

50 En una modalidad de la descripción, el gen que codifica para la proteína antipatógena de la presente invención se usa para mejorar los niveles de resistencia y de defensa de las plantas frente a diversos agentes patógenos. Por tanto, la presente descripción incluye un método para aumentar la resistencia a enfermedades de plantas producidas por agentes patógenos, mediante la transformación genética de la planta con una secuencia de ácido nucleico: Sec. con núm. de ident. 1 que conduce a la expresión constitutiva o inducida de la proteína antipatógena Sec. con núm. de ident. 6.

55 La molécula de ácido nucleico objeto de la presente descripción puede usarse para la transformación de plantas. En una modalidad preferida, la secuencia de ADN que codifica para la proteína antipatógena puede usarse para la transformación de las siguientes especies de plantas: *Zea mays*, *Brassica sp.*, *Medicago sativa*, *Oryza sativa*, *Sorgo bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Pennisetum glaucum*, *Helianthus annuus*, *Triticum aestivum*, *Glycine max*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Patatas dulces Ipomoea*, *Manihot esculenta*, *Coffea spp.*, *Pineapples comosus*, *Citrus spp.*, *Theobroma cacao*, *Camellia sinensis*, *Musa spp.*, *Persea americana*, *Ficus casica*, *Psidium guajava*, *Mangifera*

*indica, Carica papaya, Beta vulgaris, Saccharum spp., Lycopersicon esculentum, Lactuca sativa, Phaseolus vulgaris, Cucumis Sativus, Cucumis melo, Hibiscus rosasanensis, Rosa spp., Tulipa spp., Pinus taeda, Pinus elliotii, Pinus pesado, Pinus contorta, Pinus radiata.*

5 La presente descripción puede usarse en una variedad de métodos para obtener plantas de interés agrícola que produzcan la proteína antipatógena. De esta manera, la secuencia de ácido nucleico (Sec. con núm. de ident. 1) que codifica para la proteína antipatógena puede usarse en combinación con un promotor que se introduce en una planta de interés agrícola. Para lograr la expresión de altos niveles de la proteína antipatógena puede usarse un promotor constitutivo. En otras formas, la secuencia que codifica para la proteína antipatógena puede manipularse y fusionarse a un promotor específico para dirigir la expresión en un tejido particular en una planta susceptible a un patógeno.

15 La invención proporciona, además, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos identificada como Sec. con núm. de ident. 6, o Sec. con núm. de ident. 7, o Sec. con núm. de ident. 9, o un polipéptido que comprende en su cadena polipeptídica una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 60 % con la Sec. con núm. de ident. 6, en donde dicho polipéptido tiene una actividad antipatógena para controlar la infección de bacterias u hongos fitopatógenos. Otro objeto de la descripción es un polipéptido con la secuencia de aminoácido Sec. con núm. de ident. 6, o Sec. con núm. de ident. 7. Cualquiera de estos polipéptidos tiene actividad biológica sobre agentes patógenos, por lo que en esta descripción se denominan proteínas antipatógenas. Otro objeto de la descripción es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido con al menos 60 % de identidad con la Sec. con núm. de ident. 6.

20 En una modalidad preferida los polipéptidos o las proteínas antipatógenas de la invención se obtienen por vía recombinante o por síntesis química. Las proteínas antipatógenas de la descripción pueden expresarse mediante la tecnología del ADN recombinante en diferentes sistemas hospederos, y aislarse de estos. En una modalidad de la descripción la proteína antipatógena puede expresarse en levaduras. En una modalidad preferida, la expresión por la vía del ADN recombinante se realiza en *Pichia pastoris*, preferentemente en el sobrenadante de cultivo. A partir de los hospederos, los polipéptidos de la descripción pueden obtenerse mediante la aplicación de las técnicas de aislamiento de proteínas. El proceso de purificación puede lograrse mediante el uso de técnicas inmunoenzimáticas, cromatográficas, de precipitado celular, y otros procesos que se conocen en la técnica.

25 Además, son objeto de la presente descripción las variantes de secuencias de aminoácidos (Sec. con núm. de ident. 6) que se fusionan con péptidos estabilizadores o que dirijan la expresión a determinados compartimentos del hospedero, y mantengan la actividad biológica demostrada para esa molécula. Un ejemplo es la proteína fusionada cuya secuencia aparece como la Sec. con núm. de ident. 7. Los fragmentos de la proteína antipatógena identificados en el Listado de Secuencias como Sec. con núm. de ident. 8 y Sec. con núm. de ident. 9, que retienen la actividad de control sobre agentes patógenos son, además, objeto de la presente descripción. Otro aspecto de la presente descripción es un bioproducto para el control de agentes patógenos identificados como Sec. con núm. de ident. 6, Sec. con núm. de ident. 7 o un polipéptido con al menos un 60 % de identidad con la Sec. con núm. de ident. 6.

30 En esta descripción estas proteínas antipatógenas se usan, por primera vez, en bioproductos que confieren altos niveles de protección frente a las principales enfermedades de plantas producidas por agentes patógenos, con alta estabilidad y baja contaminación, por lo que su uso presenta mejor percepción pública y menos requerimientos regulatorios. El bioproducto que contiene la proteína antipatógena de la presente descripción produce altos niveles de protección frente a bacterias y hongos, no reportados anteriormente.

35 La presente descripción proporciona, además, una formulación para el control de agentes patógenos que comprende un polipéptido identificado como Sec. con núm. de ident. 6, Sec. con núm. de ident. 7 o un polipéptido con al menos 60 % de identidad con la Sec. con núm. de ident. 6, en donde el polipéptido está en un intervalo de concentración entre 1 a 9 µg/ml, en donde dicho polipéptido tiene una actividad antipatógena, en donde dichos agentes patógenos son bacterias u hongos fitopatógenos. Para lograr el bioproducto, la proteína antipatógena puede formularse a través de una suspensión, solución, emulsión, polvo, gránulo, concentrado emulsionable, aerosol, gránulo impregnado adyuvante, pasta, o a través de encapsulaciones. En una modalidad de la descripción, el bioproducto contiene el polipéptido purificado a partir de un hospedero transformado genéticamente, o se usa directamente el sobrenadante de un cultivo del hospedero que lo contiene. En una modalidad preferida el hospedero es *P. pastoris*.

40 En una materialización de la descripción, las proteínas antipatógenas cuyas secuencias se reivindican pueden usarse, al igual que los bioproductos que las contienen, por primera vez, para el control de una amplia variedad de patógenos como: *Aspergillus, Penicillium, Alternaria (Alternaria), alternaria (alternaria alternata); Bipolaris sacchari, Botrytis cinerea; Cercospora (Cercospora kikuchii, Cercospora zaeamaydis; medicaginis Cercospora; Cercospora soja; Cercospora Sorghi); Cladosporium fulvum; Colletotrichum (Colletotrichum lindemuthianum; Colletotrichum dematium, Colletotrichum graminicola), Diplodia maydis; Erysiphe (Erysiphe graminis f graminis; Erysiphe graminis f hordei) Fusarium (Fusarium nivale; Fusarium oxysporum, Fusarium graminearum; Fusarium culmorum, Fusarium solani; Fusarium moniliforme Fusarium roseum); Helminthosporium (Helminthosporium turcicum, Helminthosporium carbonum, Helminthosporium maydis); Maganaporthe grisea; Mycosphaerella figensis; Peronospora (Peronospora manshurica; Peronospora tabacina); Phoma betae; Phytophthora (Phytophthora cinnamomi, Phytophthora cactorum, Phytophthora phaseoli; Phytophthora parasitica; Phytophthora citrophthora, Phytophthora sojae megasperma oxysporum; Phytophthora infestans), Puccinia (Puccinia Sorghi; Puccinia striiformis, Puccinia graminis f tritici; Puccinia esparragos; Puccinia*

redondita ; *Puccinia arachidis*; *Puccinia melanocephala*), *Pythium* (*Pythium aphanidermatum*; *Pythium ultimum*); *Pyricularia oryzae*; *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*); *Scerotium rolfsii*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Septoria* (*Septoria lycopersici*, *Septoria glicina*: *Septoria nodorum*; *Septoria tritici*); *Thielaviopsis basicola*; *Ustilago* (*Ustilago maydis*; *Ustilago scitaminea*); *Verticillium* (*Verticillium dahliae*; *Verticillium alboatrum*); *Pseudomonas syringae* p.v. *Glicina*; *Xanthomonas campestris* p.v. *Phaseoli*; *Xanthomonas campestris* p.v. *Alfalfa* *Xanthomonas campestris* p.v. *Translucens*; *Pseudomonas syringae* p.v. *Syringae*; *Erwinia carotovorum* p.v. *Carotovora*; *Erwinia stewartii*, *Clavibacter michiganense* subsp. *Nebraskense*; *Pseudomonas avenae*; *Erwinia chrysanthemi* p.v. *Zea*; *Erwinia carotovora*; *Xanthomonas campestris* p.v. *Holcicola*, *Pseudomonas andropogonis* y *Pseudomonas avenae*. En una modalidad favorita el bioproducto es útil para el control de hongos fitopatógenos. En una materialización de la descripción el polipéptido se incluye en el bioproducto en el intervalo de concentración entre 1 a 9 µg/ml.

La presente invención se refiere, además, a un método para el control de agentes patógenos de plantas, que se caracteriza por la aplicación del polipéptido de la invención a las plantas, en donde dichos agentes patógenos son bacterias u hongos fitopatógenos.

Es parte de la presente descripción, además, un método para el control de agentes patógenos de plantas que se caracteriza por la aplicación del bioproducto a las plantas, el cual comprende un polipéptido identificado como Sec. con núm. de ident. 6, Sec. con núm. de ident. 7, o un polipéptido con al menos un 60 % de identidad con la Sec. con núm. de ident. 6. En otra materialización de la descripción, el método para el control de agentes patógenos de plantas se caracteriza por la aplicación del bioproducto de la descripción en combinación con biopesticidas.

La presente invención proporciona, además, una planta modificada genéticamente que comprende la secuencia de ácido nucleico identificada como Sec. con núm. de ident. 1 para incrementar su resistencia a las enfermedades de plantas que producen los agentes patógenos, en donde dichos agentes patógenos son bacterias u hongos fitopatógenos.

Además, son parte de la presente descripción, las plantas modificadas genéticamente con la secuencia de ácido nucleico: Sec. con núm. de ident. 1, o una secuencia de ácido nucleico de la Sec. con núm. de ident. 1 (plantas transgénicas), para aumentar la resistencia a enfermedades de plantas que producen los agentes patógenos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Estrategia de clonación de la proteína antipatógena de interés en los vectores de expresión en plantas (Fig. 1 A) y en levadura (Fig. 1B).

Figura 2. Expresión de la proteína antipatógena en *Pichia pastoris*, mediante el uso del vector pPIC9K, fusionada al péptido señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*. Producción de la proteína antipatógena en el sobrenadante de *P. pastoris* (A) y la fracción purificada (B).

Figura 3. Experimento de expresión constitutiva de la proteína antipatógena en plantas transgénicas y evaluación de la resistencia a enfermedades. La gráfica representa el porcentaje de hojas y tallos con síntomas de las enfermedades en las muestras controles y los clones transgénicos que expresan la proteína antipatógena. (Figura 3A) Efecto de *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* sobre hojas de tabaco. (Figura 3B) Efecto de *Alternate solani* sobre hojas de papa. (Figura 3C) Efecto de *Phytophthora parasitica* sobre tallos de tabaco, (Figura 3D) Efecto de *Phytophthora infestans* sobre hojas de papa. En las figuras las barras representan: a. control inoculado, b. control no inoculado, c. clon 1.1, d. clon 1.2, y e. clon 1.3.

Figura 4. Experimento de actividad de la proteína antipatógena frente a diversos patógenos de plantas a diferentes concentraciones. La gráfica representa el porcentaje de inhibición del crecimiento de los patógenos en medio líquido tratados a diferentes concentraciones de la proteína antipatógena fusionada al péptido señal del factor alfa (A) y sintetizada sin el péptido señal (B). Leyenda de la Figura 4B: □ efecto de la proteína fusionada al péptido señal del factor alfa sobre *Phytophthora infestans*, ♦ efecto de la proteína sin el péptido señal sobre *Phytophthora infestans*, ■ control.

Figura 5. Experimento del efecto de la formulación de la proteína antipatógena NmDef-02 sobre el control de hongos del suelo (A) y aéreos (B). En la figura las barras representan: ■ plantas controles, □ plantas tratadas con fungicidas, ♦ plantas tratadas con la formulación de la proteína antipatógena.

Figura 6. Actividad biológica de fragmentos de la proteína antipatógena NmDef-02 sobre *Phytophthora infestans*. □ efecto del péptido Sec. con núm. de ident. 8 sobre *Phytophthora infestans*, ♦ efecto del péptido Sec. con núm. de ident. 9 sobre *Phytophthora infestans*.

## EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación del material vegetal, aislamiento y clonación del ADN que codifica para la proteína antipatógena NmDef-02 de *Nicotiana megalosiphon*.

La especie *N. megalosiphon* se creció en macetas de 6 pulgadas que contenían turba negra y cáscara de arroz en una proporción (4:1) y se mantuvieron en condiciones de casas verdes a 23 °C. Un aislado de *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* que se colectó en un campo de tabaco en La Habana se usó para las inoculaciones. Las inoculaciones se realizaron en plantas de esta especie, de 6 semanas de edad, se colocaron varias gotas de 10 µl con una concentración de 5 x 10<sup>3</sup> esporas por ml. Las plantas se colocaron en bolsas plásticas negras con alta humedad (la humedad se logró al rociar agua en el interior de las bolsas) durante un período de 12 horas, para promover la infección.

El ARN total de las plantas de *N. megalosiphon*, que se inocularon 6 días más tarde, se extrajo de las hojas mediante el uso del sistema de extracción de ARN total por centrifugación (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Finalmente, se sintetizó el ADN complementario (ADNc) de doble cadena, mediante el sistema de síntesis de ADNc de Promega.

Se construyó la librería de ADNc por hibridación sustractiva mediante el uso del sistema selectivo de hibridación sustractiva por supresión (Clontech, Palo Alto, AC, EE.UU.). El ADNc que se obtuvo de plantas *N. megalosiphon* que se inocularon con *P. hyoscyami* y se cosecharon 6 días después de la inoculación, se usó como muestra para la sustracción. La librería sustraída se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega) de acuerdo con las instrucciones.

La secuenciación del ADNc se desarrolló mediante el uso de un secuenciador automático. Después del análisis de las secuencias se seleccionó una secuencia de ADN que tenía bajos niveles de identidad con proteínas reportadas en las bases de datos, la cual se usó en los experimentos posteriores.

#### Ejemplo 2. Transformación de plantas con el gen de la proteína antipatógena *NmDef-02*.

Producción de plantas transgénicas de tabaco: construcción de los vectores binarios.

En este experimento el ADNc completo del gen que codifica para la proteína antipatógena se aisló con los oligonucleótidos Sec. con núm. de ident. 2 y Sec. con núm. de ident. 3 y se clonó en el vector de transformación pCambia 2300 en los sitios de restricción Hind III/Pst I (Figura 1A). La transformación genética de plantas de *Nicotiana tabacum* se realizó por el método descrito por Zambryski y otros. (1983) en EMBO Journal, 2: 2143-2150. Para este propósito, se usó la cepa AT 2260 de *Agrobacterium tumefaciens* y el método del nitrógeno líquido (Hofgen and Willmitzer (1988) *Nuci. Acids Res.* 16: 9877) con el vector binario desarrollado. Se transformaron discos de hojas de plantas de *N. tabacum* de la variedad Petit Havana SR 1, cultivadas *in vitro*. Se usó kanamicina a 100 mg/l como marcador de selección del evento de transformación. Los discos de hojas se cultivaron junto con la *Agrobacterium* recombinante durante 48 horas en medio líquido Murashige y Skoog (MS). La regeneración de las plantas de tabaco (4-6 semanas) se efectuó en el medio MS que contenía: sacarosa 25 g/l, 6-Bencil amino purina (BAP) 1 mg/l, ácido naftalén acético (ANA) 0.1 mg/l, kanamicina 100 mg/l y claforán (Claf) 500 mg/l. El enraizamiento de las plantas (1-3 semanas) se realizó en medio MS que contenía: sacarosa 30 g/l, kanamicina 100 mg/l y Claf 500 mg/l.

Producción de plantas transgénicas de papa: construcción de los vectores binarios.

En este experimento el ADNc completo del gen que codifica para la proteína antipatógena se aisló con los oligonucleótidos de las Sec. con núm. de ident. 2, y Sec. con núm. de ident. 3 y se clonó en el vector de transformación pCambia 3300 en los sitios de restricción Hind III/Pst I (Figura 1A). El material vegetal que se usó en los experimentos de cultivo de tejidos y transformación se tomó de plántulas *in vitro* del cultivo de papa Désirée". Las plantas se crecieron en tubos de ensayos en medio MS. El pH en los medios de cultivo se ajustó a 5,7. Se usaron plantas de cuatro semanas de cultivo, se mantuvieron en cuartos con 25 °C y una iluminación de 2000 Lux. Los medios de cultivo que sirvieron de base para los experimentos de regeneración y transformación fueron el SC (Sales MS, vitamina B1 0,4 mg/l, mioinositol 100 mg/l, sacarosa 20 g/l, BAP 3,5 mg/l, ANA 0,01 mg/l, fitoagar 6 g/l), el SB (Sales MS, mioinositol 100 mg/l, sacarosa 20 g/l, AG<sub>3</sub> 3,5 mg/l, fitoagar 6 g/l) y el PP (Sales MS, vitamina B1 0.4 mg/l, mioinositol 100 mg/l, pantotenato de calcio 2 mg/l, sacarosa 30 g/l, fitoagar 6 g/l, carbón activado 5 g/l y Nitrato de Plata y Tiosulfato de Sodio 1mg/l (STS).

Para la transformación se usaron las cepas de *Agrobacterium* "At2260" y "LBA 4404". La bacteria se cultivó en un medio de cultivo con extracto de levadura 1 g/l, bactopectona 1 g/l, sacarosa 5 g/l y Lab-lemco en polvo 5 g/l, a 28 °C en condiciones de oscuridad hasta alcanzar una densidad óptica (DO)<sub>620</sub> de 0,7-0,9.

El procedimiento de transformación regeneración se desarrolló en dos etapas, de la siguiente forma: los segmentos de tallos de plantas *in vitro* de 4 semanas de cultivo se incubaron en medio MS durante 12-16 horas a 25 °C en la oscuridad, después se desarrolló la infección con *A. tumefaciens* mediante la incubación de los explantes durante 7 minutos con 1 ml de la suspensión bacteriana por cada 20 ml de medio MS; los explantes se cocultivaron en medio SC durante 48 horas a 22 °C en la oscuridad y se colocaron sobre un papel de filtro estéril. El lavado de los explantes en medio MS y secado con papel de filtro estéril se realizó cuidadosamente. En una primera etapa los explantes se cultivaron durante 15 días en condiciones de luz en medio selectivo SC, claforán 500 mg/l y Fosfinotricina (PPT) 5 mg/l, y en una segunda etapa estos se cultivaron en condiciones de luz en medio selectivo SB, claforán 500mg/l y PPT 5 mg/l. Finalmente, los brotes se individualizaron en medio selectivo PP, con claforán 500 mg/l y se seleccionaron en PPT 5 mg/l.

Ejemplo 3. Evaluación del efecto de la proteína antipatógena *NmDef-02* sobre la resistencia a enfermedades.

Experimento de resistencia en tabaco a la enfermedad causada por *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*.

Las plantas con raíces, resistentes al antibiótico kanamicina y con el gen de la proteína antipatógena, se sembraron en macetas para su adaptación en condiciones de casas verdes durante 45 días. Después de ese período un grupo de 100 clones transgénicos de 6 semanas de edad se inocularon con *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* mediante la adición de varias gotas de 10 µl con una concentración de  $5 \times 10^3$  esporas/ml. Las plantas se colocaron en bolsas plásticas negras y se rociaron con agua durante un período de 12 horas, para promover la infección. La evaluación de la susceptibilidad se realizó mediante el cálculo del porcentaje de las hojas con síntomas de la enfermedad una semana más tarde (Figura 3A). Como puede apreciarse en la Figura 3A se lograron altos niveles de resistencia a este patógeno, cuando se compara el porcentaje de hojas con síntomas entre el control inoculado y los diferentes clones, lo que muestra la utilidad de la proteína antipatógena que se usó para el control de este importante patógeno.

Experimento de resistencia en tabaco a la enfermedad causada por *Phytophthora parasitica*.

Las plantas con raíces, resistentes al antibiótico kanamicina y con el gen de la proteína antipatógena, se sembraron en macetas para su adaptación en casas verdes durante 45 días. Después de ese período un grupo de 100 clones transgénicos de 6 semanas de edad se inocularon con *P. parasitica* y se evaluó el porcentaje de tallos con síntomas de la enfermedad un mes más tarde.

Para el procedimiento de evaluación el patógeno *P. parasitica* se creció en placa Petri que contenía el medio Papa dextrosa Agar (PDA) a una concentración de 39 g/l. El patógeno se incubó a 27 °C, durante 10 días. Para la inoculación de las plantas de tabaco se colocó un disco (diámetro=1 cm) de PDA, que contenía el patógeno, en la base del tallo y se incubó a una temperatura de 28 °C, con alta humedad (Figura 3B). Como puede apreciarse en la figura 3B los clones que expresan la proteína antipatógena lograron altos niveles de resistencia nunca antes vistos frente a este patógeno del suelo que ocasiona grandes pérdidas en la fase de semillero de este cultivo. Este resultado demuestra que es factible el uso de esta proteína para el control de este patógeno.

Experimento de resistencia en papas a la enfermedad causada por *Phytophthora infestans*.

Esta prueba consistió en la inoculación de *Phytophthora infestans* en plantas de papa transgénicas de 5 semanas de edad bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad relativa. Aproximadamente, 100 clones de 5 semanas de edad, que expresan la proteína antipatógena, se rociaron con una suspensión de  $10^6$  zoosporas /ml. Los clones se mantuvieron bajo condiciones controladas con una humedad relativa entre 85 – 95 % y una temperatura de 23 °C. El porcentaje de hojas con síntomas se utilizó como medida de susceptibilidad al patógeno una semana después de las inoculaciones (Figura 3C). Este fue un resultado inesperado, ya que este patógeno es extremadamente difícil de controlar. En la figura 3C, los clones que expresan la proteína antipatógena mostraron altos niveles de resistencia, en comparación con los controles. Este resultado señala el potencial para el uso de esta proteína en el control de este patógeno en particular, por su importancia a nivel mundial.

Experimento de resistencia en papas a la enfermedad causada por *Alternaria solani*.

El hongo *Alternaria solani* se inoculó en 100 plantas de papa transgénicas de 5 semanas de edad bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad relativa. Los clones se rociaron con una suspensión de  $10^6$  esporas/ml. Los clones se mantuvieron bajo condiciones controladas con una humedad relativa entre 85 - 95 % y una temperatura de 20 °C. El porcentaje de hojas con síntomas se usó como medida de susceptibilidad al patógeno una semana después de las inoculaciones (Figura 3D). Los tres clones que se analizaron mostraron altos niveles de resistencia a este patógeno lo cual, por primera vez ofrece un potencial para el uso de esta proteína para el control.

Ejemplo 4. Construcción del vector para la expresión de la proteína antipatógena *NmDef-02*, de forma extracelular, en el sobrenadante de cultivo de *Pichia pastoris*.

El gen que codifica para la proteína antipatógena de *N. megalosiphon* se aisló mediante el uso de los oligonucleótidos específicos correspondientes a las Sec. con núm. de ident. 4 y Sec. con núm. de ident. 5 para obtener la secuencia completa del gen que codifica para la proteína antipatógena *NmDef-02*, con los sitios de restricción enzimática *Xho* I/*EcoR* I, necesarios para la clonación en el vector de expresión pPIC9k. Esta estrategia de clonación adiciona a la proteína de interés en el extremo amino terminal el péptido señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1B), por lo que la proteína resultante se corresponde con la Sec. con núm. de ident. 7. El plásmido se linearizó con *Bgl* II antes de transformar la cepa de GS115 de *P. pastoris*. La transformación se realizó mediante electroporación. La cepa GS115 es un mutante auxotrófico *his3* la cual adquiere un fenotipo *His*<sup>+</sup> después de la transformación. Los clones *His*<sup>+</sup> se seleccionaron en medio mínimo con glucosa, los clones se cultivaron en medio mínimo con glicerol e se indujeron con metanol durante 126 horas a 28 °C.

Los clones transformados se identificaron por Dot Blot. Mediante el uso de la técnica de Southern Blot se determinó en cuales ocurrió la integración, por sustitución del gen AOX1 de *P. pastoris*, por la expresión del plásmido recombinante, el cual se corresponde con un fenotipo Mut<sup>s</sup> (baja utilización de metanol) e His<sup>+</sup>. *P. pastoris* secreta bajos niveles de proteínas propias y su medio de cultivo no necesita suplementos proteicos, por lo que puede esperarse que una proteína que se secreta al medio subcelular, constituya la mayoría de las proteínas totales en el cultivo (más de un 80%) (Tschopp y otros. (1987) Bio/Technology 5:1305-1308). La expresión de la proteína antipatógena en *P. pastoris* se realizó en fermentadores de 5 litros mediante la adición de metanol al medio de cultivo. La expresión de la proteína antipatógena y su integridad se chequearon mediante espectrometría de masas.

Ejemplo 5. Purificación y ensayo de la actividad biológica de la proteína antipatógena.

La proteína antipatógena fusionada al péptido señal del factor alfa (*NmDef-Plus*) se purificó a partir del sobrenadante del medio de cultivo, por diálisis en 25 mM de acetato de sodio a pH 4,5; el producto de la diálisis se pasó a través de una resina de intercambio catiónico CM-Sepharosa Fast-flow equilibrada con 25 mM de acetato de sodio, pH 4,5; y las proteínas se extrajeron con cloruro de sodio 1 M, y Tris pH 7,6 50 mM. Las fracciones que contenían la proteína se colectaron y se concentraron mediante un sistema de ultracentrifugación con una membrana con un tamaño de poros (cut-off) de 3 kDa. Para la detección se usó una longitud de onda de 254 nm. La purificación se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-PAGE, Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (15 % Tris-Glicina) y las proteínas se visualizaron por tinción con plata (Figura 2).

La actividad antifúngica de la proteína antipatógena se cuantificó a través del método espectrofotométrico y del análisis del micelio mediante tinción con lactofenol azul a través de microscopía óptica (Terras y otros. (1992) J. Biol. Chem. 267: 14301- 15309). La evaluación se realizó en placas de 96 pozos, en los cuales se añadieron 50 µl de medio líquido papa dextrosa, 50 µl de la suspensión de esporas del patógeno y 20 µl de la proteína antipatógena purificada parcialmente.

El porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) del patógeno se determinó según lo reportado anteriormente (Terras y otros. (1992) J. Biol. Chem. 267: 14301- 15309), mediante la siguiente ecuación:

$$PIC = \frac{DO_{595 \text{ nm control}} - DO_{595 \text{ nm tratamiento}}}{DO_{595 \text{ nm control}}} \times 100$$

La relación entre los porcentajes de inhibición proviene de la aplicación de la ecuación anterior a las lecturas realizadas (a 595 nm) de los controles y de las muestras tratadas 48 horas después que comenzó el experimento (Figura 4A).

La proteína antipatógena sin el péptido señal del factor alfa se sintetizó químicamente, y su efecto se evaluó sobre el patógeno *P. infestans* a diferentes concentraciones según lo reportado anteriormente (Terras y otros. (1992) J. Biol. Chem. 267: 14301-15309) (Figura 4B).

En las Figuras 4A y 4B, la proteína antipatógena logró altos niveles de inhibición del crecimiento frente a hongos fitopatógenos de plantas, ya sea la fusionada al péptido señal del factor alfa o la que se sintetizó químicamente sin el péptido señal. Fue muy interesante observar, por primera vez, la inhibición de patógenos importantes de las plantas, no logrado hasta el momento por otras proteínas antifúngicas reportadas. Otros resultados no esperados y que permiten el uso de esta proteína antipatógena con un amplio espectro de acción, fueron los grandes niveles de inhibición que mostró frente a bacterias fitopatógenas (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la proteína antipatógena *NmDef-02* sobre bacterias fitopatógenas.

Especies de bacterias	IC <sub>50</sub> (µM)
<i>Xanthomonas campestris</i> p.v. <i>phaseoli</i>	40 ± 3
<i>Pseudomonas syringae</i> p.v. <i>syringae</i>	26 ± 6
<i>Erwinia carotovorum</i> p.v. <i>carotovora</i>	86 ± 8
<i>Pseudomonas avenae</i>	17 ± 5
<i>Erwinia chrysanthemi</i> p.v. <i>zea</i>	11 ± 8

IC<sub>50</sub>: concentración de *NmDef-02* en la que el crecimiento de la bacteria se inhibe en un 50 %.  
± Desviación estándar de la media.

Ejemplo 6. Demostración del control de una formulación de la proteína antipatógena *NmDef-02* sobre hongos patógenos del suelo y aéreos.

- 5 Las semillas de la especie *N. tabacum* se trataron con la formulación de la proteína antipatógena (9 µg/ml) y alginato de sodio al 5 %, después de que germinaran en macetas de 6 pulgadas que contenían turba negra y cáscara de arroz en una proporción (4:1) y se mantuvieron en casas verdes a 23 °C. Como controles del tratamiento se usaron semillas que se trataron con hipoclorito de sodio al 10 % y otras sin ningún tipo de tratamiento. Las evaluaciones se realizaron a los 30 días y se determinó el porcentaje de plantas muertas producto de la infección natural (Figura 5A).
- 10 Por otra parte, 100 plantas en casas verdes se rociaron con la formulación de la proteína antipatógena con una concentración del principio activo de 5 µg/ml y alginato de sodio al 5 %. Los controles se rociaron con el fungicida Benomil a una concentración de 40 g/l y agua. Se evaluó el porcentaje de hojas con síntomas, producto de la infección natural, a los 45 días después de aplicar los tratamientos (Figura 5B).
- 15 En las Figuras 5A y 5B la formulación de la proteína antipatógena logró el control de hongos patógenos del suelo y aéreos en comparación con los controles utilizados; este resultado no se reportó hasta el momento, lo que permite el uso de esta proteína como un bioproducto en el control de patógenos de las plantas.

Ejemplo 7. Actividad biológica de los fragmentos de la proteína antipatógena *NmDef-02*.

- 20 Los fragmentos de la proteína antipatógena *NmDef-02* se obtuvieron por síntesis química (Sec. con núm. de ident. 8 y Sec. con núm. de ident. 9). El efecto sobre el hongo *P. infestans* se evaluó a diferentes concentraciones según lo reportado (Terras y otros. (1992) J. Biol. Chem. 267: 14301-15309), lo cual se muestra en la Figura 6. El resultado que se obtuvo permite el uso de las fracciones de la proteína para lograr el control o la inhibición de patógenos cuando se emplea la fracción de la proteína de la Sec. con núm. de ident. 9.
- 25

# ES 2 619 512 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
- <120> SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO Y AMINOÁCIDOS PARA EL CONTROL DE AGENTES PATÓGENOS.
- 5 <130> producto antipatógeno
- <140>  
<141>
- 10 <150> CU 2008- 0045  
<151> 2008-03-28
- <160> 9
- 15 <170> PatentIn Versión 2.1
- <210> 1  
<211> 141  
<212> ADN  
<213> Nicotiana megalosiphon
- 20 <400> 1
- 25 atgctgtgagt gcaaggctca gggccgtcac actacgtggt ttcgtgacgc gaactgcgctc 60  
caagtctgtg aaaaacaggc tggctgggtca cacggggact gccgagcaca gttcaagtgc 120  
aaatgtatat tcgagtgcta a 141
- 30 <210> 2  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>  
<223> Secuencia Artificial  
Descripción: Oligonucleótidos
- <400> 2
- 40 aagcttatgc gtagtgcaa ggctc 25
- <210> 3  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>  
<223> Secuencia Artificial  
Descripción: Oligonucleótidos
- 50 <400> 3  
ctgcagttag cactcgaata tac 23
- 55 <210> 4  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 60 <220>  
<223> Secuencia Artificial  
Descripción: Oligonucleótidos

ES 2 619 512 T3

<400> 4  
ctcgagatgc gtagtgcaa ggctc 25

<210> 5  
5 <211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
10 <223> Secuencia Artificial  
Descripción: Oligonucleótidos

<400> 5  
gaattcttag cactogaata tac 23

<210> 6  
15 <211> 45  
<212> PRT  
<213> Nicotiana megalosiphon

20 <400> 6  
Arg Glu Cys Lys Ala Gln Gly Arg His Thr Thr Cys Phe Arg Asp Ala  
1 5 10 15  
Asn Cys Val Gln Val Cys Glu Lys Gln Ala Gly Trp Ser His Gly Asp  
20 25 30  
Cys Arg Ala Gln Phe Lys Cys Lys Cys Ile Phe Glu Cys  
35 40 45

30 <210> 7  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Secuencia Artificial:  
Descripción: Proteína de fusión

40 <400> 7  
Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala  
1 5 10 15  
Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala  
20 25 30  
45 Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn  
35 40 45  
Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Arg Glu  
50 55 60  
Cys Lys Ala Gln Gly Arg His Thr Thr Cys Phe Arg Asp Ala Asn Cys  
65 70 75 80  
55 Val Gln Val Cys Glu Lys Gln Ala Gly Trp Ser His Gly Asp Cys Arg  
85 90 95  
Ala Gln Phe Lys Cys Lys Cys Ile Phe Glu Cys  
100 105

60 <210> 8  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Nicotiana megalosiphon

65 <400> 8

ES 2 619 512 T3

Arg Glu Cys Lys Ala Gln Gly Arg His Thr Thr Cys Phe Arg Asp Ala  
1 5 10 15

5 Asn Cys Val Gln Val Cys Glu Lys  
20

<210> 9

<211> 21

10 <212> PRT

<213> Nicotiana megalosiphon

<400> 9

15 Gln Ala Gly Trp Ser His Gly Asp Cys Arg Ala Gln Phe Lys Cys Lys  
1 5 10 15

Cys Ile Phe Glu Cys  
20

20

Reivindicaciones

- 5 1. Un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico identificada como Sec. con núm. de ident. 1, o que codifica para un polipéptido que comprende a) la secuencia de aminoácidos identificada como Sec. con núm. de ident. 6, o b) una secuencia de aminoácidos con al menos 60 % de identidad con la Sec. con núm. de ident. 6 y que mantiene sus propiedades para controlar la infección de bacterias u hongos fitopatógenos.
- 10 2. Un método para incrementar la resistencia a enfermedades de las plantas producidas por agentes patógenos, mediante la transformación genética de la planta con una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de ácidos nucleicos identificada como Sec. con núm. de ident. 1, que conduce la expresión constitutiva o inducida de la proteína antipatógena que comprende la Sec. con núm. de ident. 6, en donde dichos agentes patógenos son bacterias u hongos fitopatógenos.
- 15 3. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos identificada como Sec. con núm. de ident. 6, o Sec. con núm. de ident. 7, o Sec. con núm. de ident. 9, o un polipéptido que comprende en su cadena polipeptídica una secuencia de aminoácidos con al menos 60 % de identidad con la Sec. con núm. de ident. 6, en donde dicho polipéptido tiene una actividad antipatógena para controlar la infección de bacterias u hongos fitopatógenos.
- 20 4. Un polipéptido de conformidad con la reivindicación 3, el cual es un polipéptido recombinante o producido por síntesis química.
- 25 5. Un polipéptido de conformidad con la reivindicación 4, en donde la expresión a través de la vía del ADN recombinante se realiza en *Pichia pastoris*, preferentemente en el sobrenadante del cultivo.
- 30 6. Un polipéptido de conformidad con la reivindicación 4, en donde el polipéptido se purifica a partir de un hospedero transformado genéticamente o se usa directamente el sobrenadante de un cultivo de tal hospedero que lo contiene, preferentemente en donde dicho hospedero es *P. pastoris*.
- 35 7. Una formulación para el control de agentes patógenos que comprende un polipéptido identificado como Sec. con núm. de ident. 6, o Sec. con núm. de ident. 7, o un polipéptido con al menos 60 % de identidad con la Sec. con núm. de ident. 6, en donde el polipéptido está en un intervalo de concentración entre 1 a 9 µg/ml, en donde dicho polipéptido tiene una actividad antipatógena, en donde dichos agentes patógenos son bacterias u hongos fitopatógenos.
- 40 8. Un método para el control de agentes patógenos de plantas caracterizado por la aplicación del polipéptido de la reivindicación 4 a las plantas, en donde dichos agentes patógenos son bacterias u hongos fitopatógenos.
- 45 9. Un método de conformidad con la reivindicación 8 caracterizado por la aplicación del polipéptido de la reivindicación 4 mezclado con biopesticidas.
10. Una planta modificada genéticamente que comprende la secuencia de ácidos nucleicos identificada como Sec. con núm. de ident. 1 para incrementar su resistencia a las enfermedades de las plantas producidas por agentes patógenos, en donde dichos agentes patógenos son bacterias u hongos fitopatógenos.

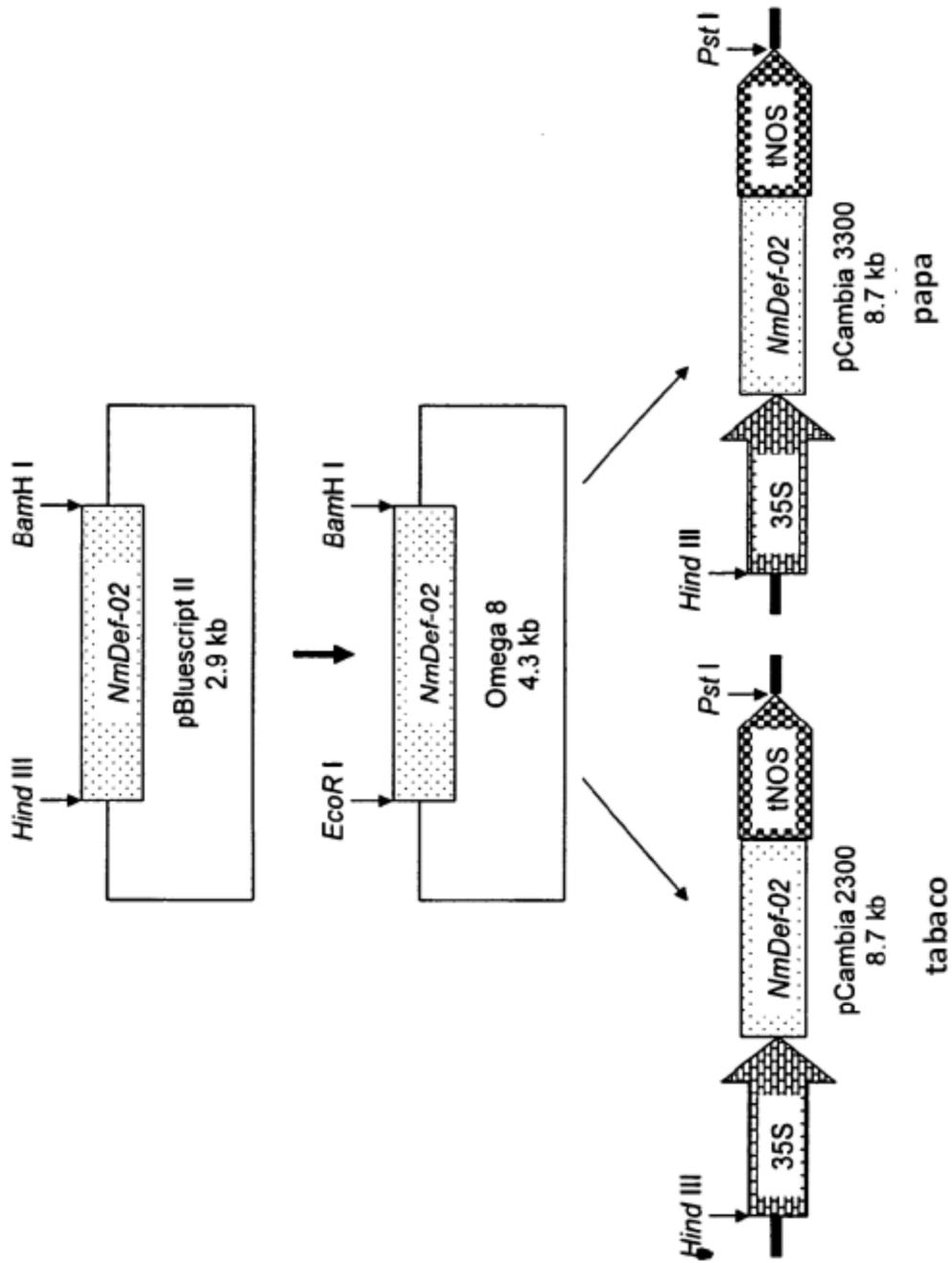


Fig. 1A

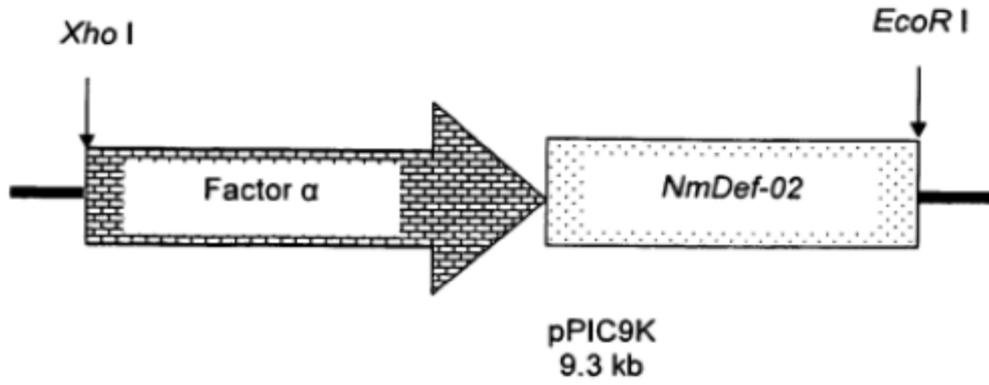


Fig. 1B

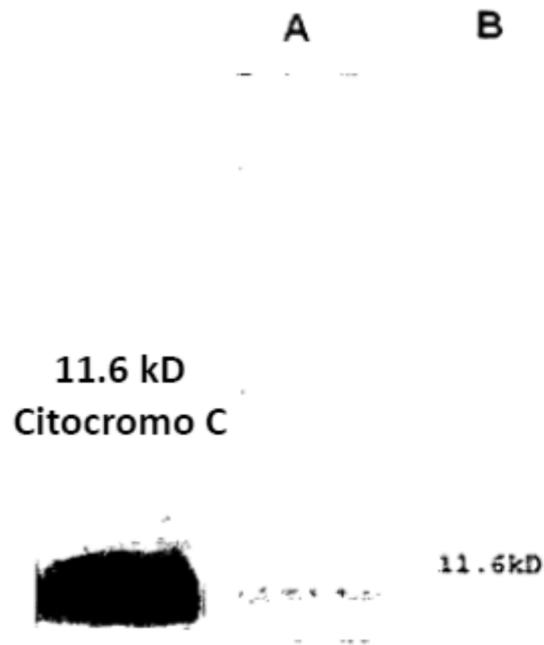


Fig. 2

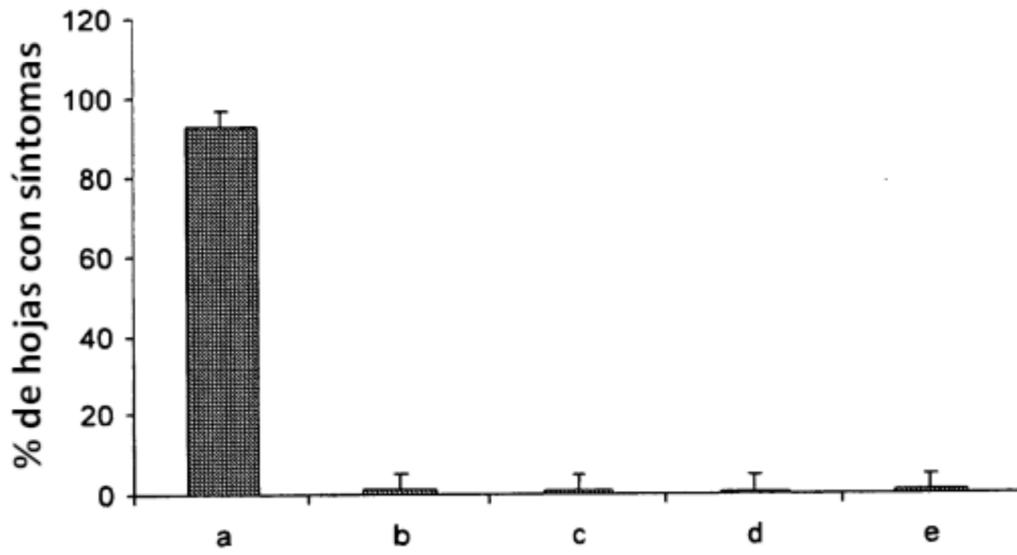


Fig. 3A

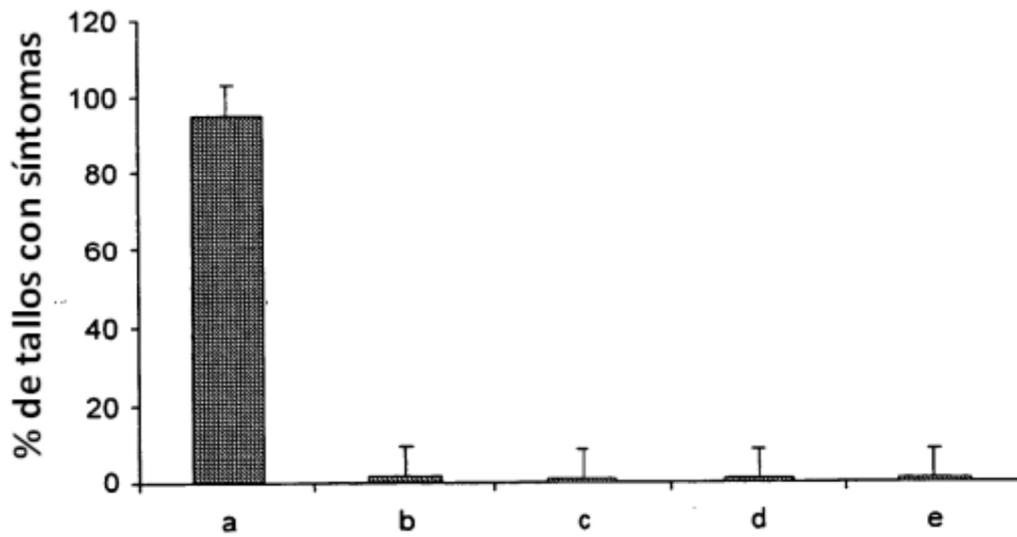


Fig. 3B

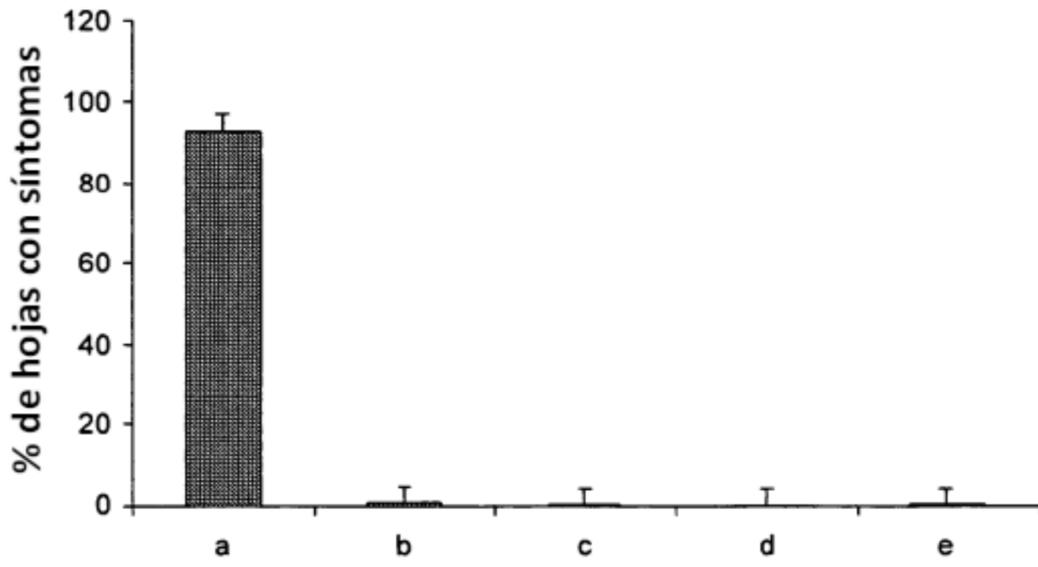


Fig. 3C

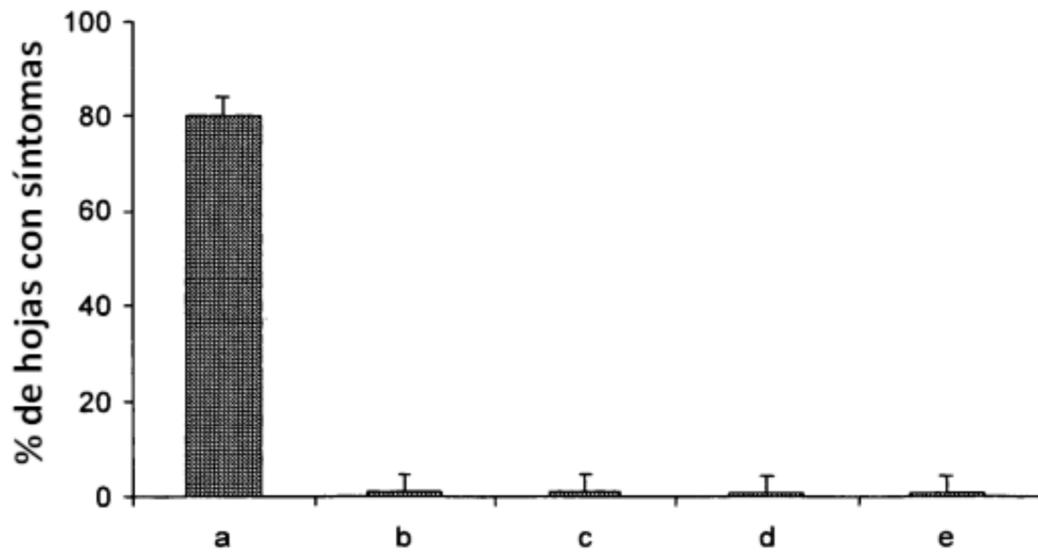


Fig. 3D

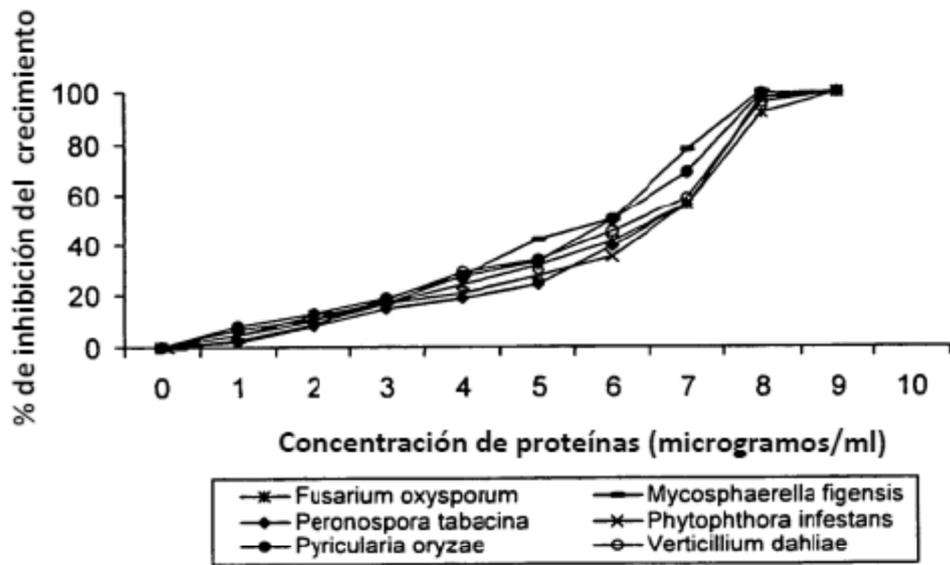


Fig. 4A

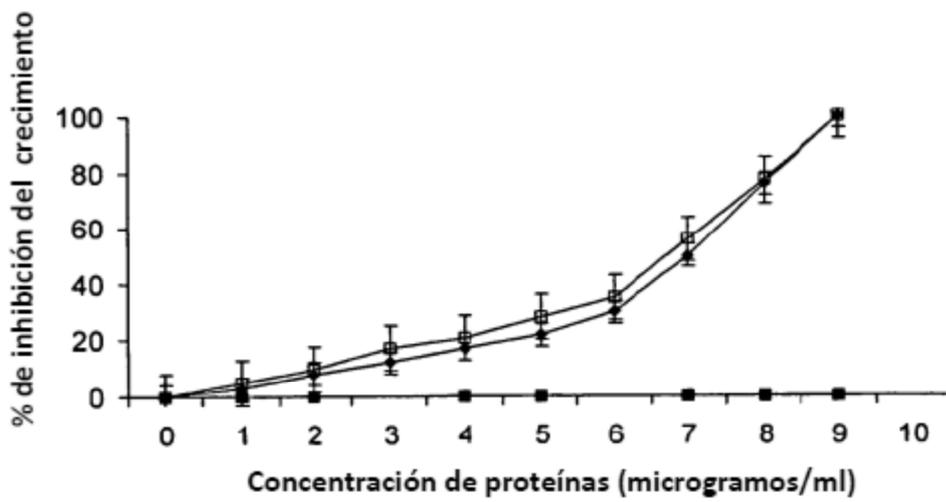


Fig. 4B

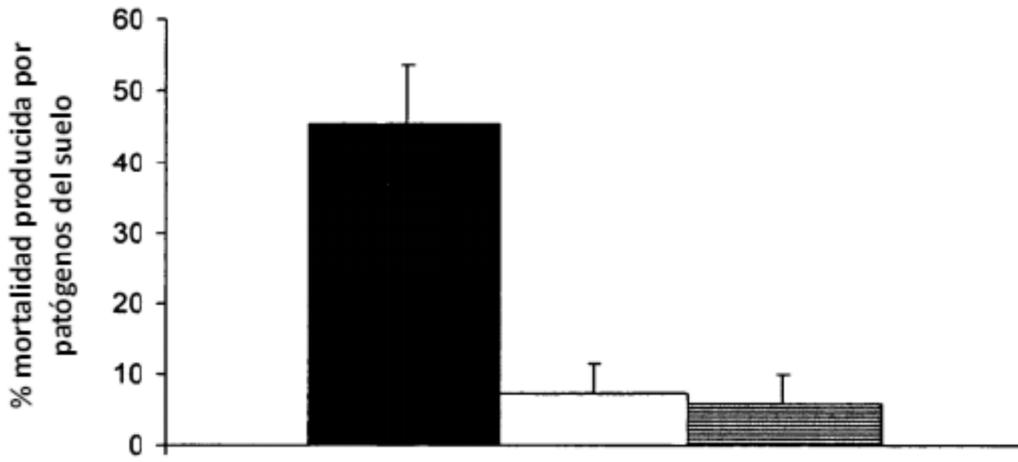


Fig. 5A

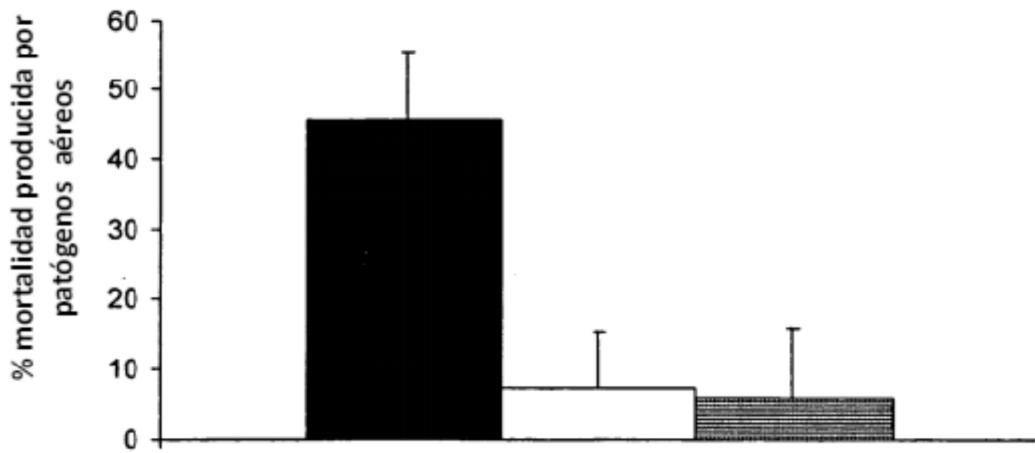


Fig. 5B

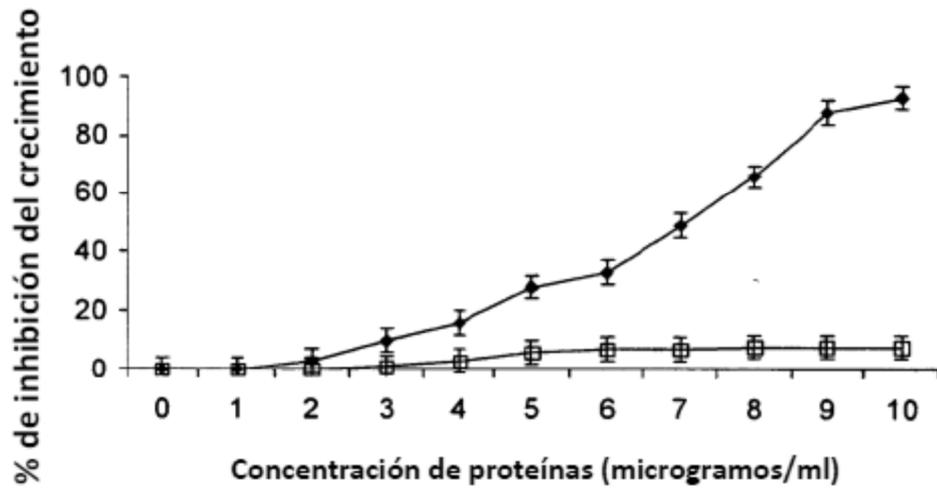


Fig. 6