

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 547**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2011 PCT/EP2011/064740**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12025621**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2011 E 11749410 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2609115**

54 Título: **Composiciones para el tratamiento de semillas**

30 Prioridad:

**07.09.2010 EP 10175543  
26.08.2010 US 402307 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.09.2017**

73 Titular/es:

**AGROSAVFE N.V. (100.0%)  
Technologiepark 4  
9052 Gent, BE**

72 Inventor/es:

**VERHEESEN, PETER;  
DE JONGHE, CHRIS y  
JONGEDIJK, ERIK**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

Observaciones :

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

**ES 2 634 547 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

Composiciones para el tratamiento de semillas

5 La presente invención se refiere a una composición para el tratamiento de semillas que comprende una proteína de unión a semilla de planta, preferentemente una proteína de unión a semilla de planta de unión al antígeno. En una realización preferida, la proteína de unión a semilla se une a un polisacárido, preferentemente pectina. La invención se refiere además al uso de una proteína de unión a semilla de planta para unir un agente de potenciamiento de planta a una semilla de planta, y a un método de tratamiento de semillas de planta.

10 La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier materia identificada en la solicitud como "invención", "realización", "aspecto", etc., que supere el alcance de la invención como se representa por las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada, sino que solo sirve de información previa para entender mejor la invención.

### Antecedentes y estado de la técnica

15 Las enfermedades y plagas transmitidas por semilla y de principio de temporada poseen consecuencias devastadoras para la producción de cultivos si no se tratan adecuadamente, ya que las semillas en germinación y las plantas emergentes son particularmente vulnerables al daño durante los estadios de crecimiento tempranos. Por tanto, es de suma importancia proporcionar protección apropiada a las semillas y plantas emergentes de plagas y enfermedades transmitidas por semilla y la tierra. Tradicionalmente, esto se ha logrado aplicando pesticidas directamente en la tierra, principalmente en forma de gránulos. En un esfuerzo por reducir el impacto de los pesticidas sobre la salud pública y sobre el entorno, avances más recientes en el control de plagas incluyen la aplicación de pesticidas directamente sobre las semillas en forma de composiciones para el tratamiento de semillas. Hoy en día está poniéndose en práctica un amplio espectro de tecnologías para tratar semillas con el fin de proporcionar protección de semillas y plantas y de mejorar el establecimiento de cultivos sanos. Estos métodos para el tratamiento de semillas incluyen desinfección, recubrimiento y granulación de las semillas.

25 Sigue siendo técnicamente exigente preparar composiciones adecuadas para el tratamiento de semillas, ya que tales composiciones deben cumplir una gran diversidad de requisitos: la composición debe adherirse bien a la superficie de la semilla, para prevenir el fácil lavado de la sustancia activa y para reducir la formación de polvo durante la siembra, pero al mismo tiempo no debe hacer que las semillas sean pegajosas, de forma que las semillas se adhieran entre sí y formen conglomerados, o de forma que el almacenamiento o la manipulación de las semillas pueda ser impedido por semillas que se adhieren a la pared del recipiente de almacenamiento o por semillas que obstruyen el equipo de siembra o por fluidez reducida de las semillas a través de una sembradora de semillas, produciendo siembra de semillas irregular. Además, la composición no debe reducir la vida de almacenamiento o duración de las semillas tratadas, la composición no debe afectar adversamente la germinación de las semillas, por ejemplo alterando el intercambio de agua y gas del entorno a la semilla una vez sembrada, y la composición no debe producir daño a la semilla o la planta de semillero debido a la fitotoxicidad de las sustancias activas presentes en la composición para el tratamiento de semillas.

30 Con el fin de garantizar la accesibilidad de la semilla tras la germinación, los documentos US 2.651.883, US 3.707.807 y US 3.598.565 describen métodos para el tratamiento de semillas usando recubrimientos de polímero soluble en agua, de manera que el recubrimiento se disolvería para permitir la exposición de las semillas al entorno para el desarrollo. Los documentos US 3.316.676 y US 4.245.432 se refieren a recubrimientos de semilla insolubles en agua pero sensibles al agua, cuya integridad se destruye o se disgrega cuando están en contacto con agua. Aunque estos métodos permiten un buen contacto entre la semilla y su entorno durante la germinación, la rápida disolución o disgregación del recubrimiento de semilla también producirá una rápida pérdida de las sustancias activas contenidas en el recubrimiento de semilla. El documento US 5.876.739 describe un recubrimiento de película basado en polímero no fitotóxico para semillas, que permite la liberación controlada de un insecticida durante un periodo de tiempo prolongado. Los documentos WO2007/103076 y WO2010/107312 también describen que recubrimientos de semilla basados en polímero pueden ser lubricados para facilitar la fluidez durante la siembra. Sin embargo, el recubrimiento se basa todavía en adherencia no específica del polímero a la semilla, y deben incorporarse agentes de potenciamiento de planta en un excedente de material de recubrimiento.

35 El documento US6228599 divulga anticuerpos anti-pectina, y el documento WO03/031477 divulga dominios de unión a hidratos de carbono.

Todavía existe la necesidad de una composición para el tratamiento de semillas que permita una unión específica del agente de potenciamiento de planta a la semilla de planta, produciendo un recubrimiento delgado y permeable, sin pérdida no deseada del agente de potenciamiento de planta en el entorno.

### Sumario de la invención

55 Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que la incorporación de una proteína de unión a semilla de planta en una composición para el tratamiento de semillas puede resolver los problemas técnicos anteriormente mencionados. Las proteínas de unión a semilla, preferentemente las proteínas de unión al antígeno que se unen

específicamente a las semillas, cuando están comprendidas en composiciones para el tratamiento de semillas, producen composiciones que pueden unir fuertemente y específicamente agentes de potenciamiento de planta beneficiosos a las semillas, mientras que todavía permiten que la interacción entre la semilla y su entorno interfiera tan poco como sea posible con el proceso de germinación natural.

- 5 En una realización preferida, la proteína de unión a semilla comprendida en la composición para el tratamiento de semillas es una proteína de unión a polisacárido. Las proteínas de unión a polisacárido son conocidas por el experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a lectinas, y proteínas de unión al antígeno.

La proteína de unión a semilla puede acoplarse directamente a un agente de potenciamiento de planta, o puede acoplarse a un vehículo que comprende el agente de potenciamiento de planta. El último caso es especialmente útil cuando se quiere una liberación lenta del compuesto, durante un cierto periodo de tiempo.

### Descripción detallada de la invención

Un primer aspecto de la invención es una composición para el tratamiento de semillas, que comprende una proteína de unión a semilla de planta.

15 Los términos “semilla” y “semilla de planta” se usan indistintamente en el presente documento y significan una semilla que ha sido recogida de una planta cultivada en un invernadero, en un vivero o en el campo, que había sido eliminada de dicha planta y separada de cualquier mazorca, tallo, cáscara externa y pulpa envolvente u otro material de planta no de semilla. Además de una semilla de planta de este tipo, los términos “semilla” y “semilla de planta” también pretenden incluir una semilla en germinación, un rizoma, esquejes de planta usados para la propagación vegetativa de una planta, y partes de planta usadas para la propagación tales como rizomas, tubérculos de patata o bulbos de flor. Preferentemente, los términos “semilla” y “semilla de planta” significan una semilla que ha sido recogida de una planta cultivada en un invernadero, en un vivero o en el campo, que había sido eliminada de dicha planta y separada de cualquier mazorca, tallo, cáscara externa y pulpa envolvente u otro material de planta no de semilla. La semilla de planta puede clasificarse además por tamaño, peso o capacidades de germinación, limpiarse, desinfectarse, desinfectarse, acondicionarse, potenciarse, granularse, incrustarse, peletizarse o recubrirse, y puede ser capaz de germinar o puede ser no germinante e incluso inactivarse deliberadamente, por ejemplo, por irradiación o calentamiento. “Planta”, como se usa en este documento, incluye gimnospermas y angiospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas, árboles, árboles frutales, cultivos de campo y de verduras y especies ornamentales.

30 Una “proteína de unión a semilla”, como se usa en este documento, significa el todo o parte de una molécula proteinácea (proteína, similar a proteína o que contiene proteína) que es capaz de unirse usando interacciones intermoleculares específicas a una molécula diana sobre la semilla, preferentemente sobre la superficie de la semilla. Una proteína de unión a semilla puede ser una molécula que existe de forma natural, puede derivarse de una molécula que existe de forma natural, o puede diseñarse por completo artificialmente. La unión de la proteína de unión a semilla a la molécula diana sobre la semilla se produce preferentemente con alta afinidad. El término “afinidad”, como se usa en este documento, se refiere al grado al que una proteína de unión a semilla se une a su molécula diana de manera que desplace el equilibrio de la molécula diana y la proteína de unión a semilla hacia la presencia de un complejo formado por su unión. La constante de disociación se usa comúnmente para describir la afinidad entre una proteína de unión a semilla y su molécula diana. Normalmente, la constante de disociación de la unión entre la proteína de unión a semilla y su molécula diana sobre la semilla es inferior a  $10^{-5}$  M, más preferentemente la constante de disociación es inferior a  $10^{-6}$  M, incluso más preferentemente la constante de disociación es inferior a  $10^{-7}$  M, lo más preferentemente la constante de disociación es inferior a  $10^{-8}$  M. La unión de la proteína de unión a semilla a la molécula diana sobre la semilla es preferentemente específica. “Específica”, como se usa en este documento, significa que la proteína de unión a semilla se une preferencialmente a una molécula diana particular que está presente en una mezcla homogénea o heterogénea de diferentes moléculas. La especificidad también puede expresarse como la diferencia en la afinidad de una proteína de unión a semilla por su molécula diana frente a la afinidad por una molécula no relacionada. Preferentemente, la relación de la afinidad de la proteína de unión a semilla por su molécula diana frente a su afinidad por una molécula no relacionada es mayor de 10, más preferentemente dicha relación es mayor de 100, lo más preferentemente dicha relación es mayor de 1000.

50 Una “composición para el tratamiento de semillas”, como se usa en este documento, significa una composición que se aplica a una semilla individual o a muchas semillas simultáneamente y que pretende controlar la germinación de semillas o influir en la velocidad de germinación, para proteger la semilla en germinación y/o la planta emergente de ataques por plagas o enfermedades, para proteger la semilla en germinación y/o la planta emergente del daño producido por malas hierbas u otras plantas no deseadas, para potenciar el vigor, crecimiento y/o establecimiento de las plantas de semillero y plantas emergentes, para potenciar el rendimiento del cultivo emergente, para influir en la captación de agua y/o retención de agua por las semillas y/o plantas de semillero, y/o puede pretender mejorar la manipulación de semillas suavizando la superficie de la semilla, o para proteger las semillas del daño durante el almacenamiento o manipulación o produciendo semillas de tamaño más o menos igual para facilitar la siembra.

Las composiciones para el tratamiento de semillas deben unirse fuertemente a la semilla, para evitar su abrasión durante la aplicación a la semilla y/o durante la manipulación de semillas y para evitar la formación de polvo durante

la siembra y para evitar el lavado de la composición una vez la semilla se planta o siembra en la tierra u otro sustrato para la propagación; por otra parte, las composiciones para el tratamiento de semillas no deben ser pegajosas con el fin de no producir la conglomeración de las semillas tratadas, y/o no producir la adhesión de las semillas a la pared de recipientes de almacenamiento o al equipo del operario usado tanto durante el tratamiento de semillas como durante la siembra o plantación. Las proteínas de unión a semilla según la invención se unen a semilla con alta afinidad y especificidad, y por tanto son componentes particularmente útiles en las composiciones para el tratamiento de semillas. La composición para el tratamiento de semillas según la invención comprende al menos una, preferentemente al menos dos, más preferentemente más de dos moléculas de proteína de unión a semilla según la invención. Una o más moléculas de proteína de unión a semilla pueden formar un agente de direccionamiento como se define después. Preferentemente, dicho agente de direccionamiento es una combinación de dos o más moléculas de proteína de unión a semilla.

En una realización preferida, la composición para el tratamiento de semillas comprende además al menos un agente de potenciamiento de planta. Un "agente de potenciamiento de planta", como se usa en este documento, significa una o más sustancias activas previstas para influir positivamente en la germinación de semilla, emergencia de la planta, crecimiento de la planta, desarrollo de la planta y/o rendimiento de la planta, que incluye, pero no se limita a, sustancias activas agroquímicas como se define adicionalmente, desinfectantes, agentes de desinfección, microorganismos (tales como bacterias *Rhizobium* o *Azospirillum* fijadoras de nitrógeno), reguladores del crecimiento de plantas (tales como ácido giberílico), (micro)nutrientes (tales como nitrato de potasio), hormonas de planta (tales como auxina), minerales, estimulantes de la germinación, humectantes, protectores del estrés o inductores de la planta (tales como factores Nod), o cualquier posible combinación de los anteriores. Un agente de potenciamiento de planta puede producirse en cualquier tipo de formulación, formulaciones preferidas son polvos, polvos humectables, emulsiones, concentrados emulsionables, polvos para extender, gránulos de prensa extrusora, suspensiones, concentrados en suspensión, suspensiones de cápsulas o concentrados fluidos. El experto en la materia entenderá que puede ser ventajoso combinar más de un agente de potenciamiento de planta: por ejemplo: una composición para el tratamiento de semillas puede contener una combinación de uno o más fungicidas con uno o más insecticidas, o una combinación de uno o más nematocidas con uno o más fertilizantes, etc. La ventaja de combinar varios agentes de potenciamiento de planta puede ser en el espectro más amplio de control de plagas y/o enfermedades, y/o por la acción sinérgica de más de un agente de potenciamiento de planta. En una realización preferida, el agente de potenciamiento de planta se usa en la composición para el tratamiento de semillas de forma que la concentración del agente de potenciamiento de planta no inhiba la germinación de semillas y sea poco, preferentemente no, fitotóxico para la semilla en germinación o la planta de semillero en crecimiento. Preferentemente, la concentración relativa del agente de potenciamiento de planta frente al peso total de semilla tratada está en el intervalo del 0,00001-20 %, más preferentemente en el intervalo del 0,0001-10 %, incluso más preferentemente en el intervalo del 0,0005-2 %, lo más preferentemente en el intervalo del 0,001-1 %.

La composición para el tratamiento de semillas de la invención puede comprender además:

- Aditivos humectantes y dispersantes, tales como poliacrilatos, poliuretanos, etc.
- Espesantes, tales como gomas naturales (goma xantana, goma arábica, goma ghatti, ...) agar, alginato, quitina, pectina, etc.
- Agentes colorantes y pigmentos de efecto, tales como colorantes, abrillantadores y pigmentos, incluyendo pigmentos perlescentes
- Agentes antiespumantes, tales como polietilenglicol, glicerina, antiespumantes de aceite mineral, antiespumantes de silicona, etc.
- Adhesivos, tales como copolímeros al azar y de bloque de óxido de alquileo, poli(acetato de vinilo), poli(alcohol vinílico), polietilenglicoles, gelatina, metilcelulosa, cera de parafina, cera de abeja, etc.
- Vehículos sólidos, tales como caolín, talco, diatomita, calcita, etc.
- Disolventes, tales como agua, hidrocarburos aromáticos (por ejemplo, xileno, naftaleno), hidrocarburos alifáticos, alcoholes, aceites vegetales, etc.

Dependiendo del tipo de semilla para la que está prevista la composición para el tratamiento de semillas, las condiciones bajo las que va a almacenarse y manipularse, las características de la tierra y las condiciones climáticas bajo las que se espera que la semilla germine y crezca, pueden añadirse uno o más de los siguientes aditivos adicionales a la composición para el tratamiento de semillas, que incluyen, pero no se limita a, protectores de UV, agentes anticongelantes, conservantes, agentes de control biológico o biocidas, tensioactivos, sustancias de relleno, agentes secuestrantes, plastificantes, fosfolípidos, agentes de flujo, agentes coalescentes, ceras y/o cargas (tales como arcilla, talco, fibra de vidrio, celulosa, madera pulverizada, etc. ).

La composición para el tratamiento de semillas como se ha descrito anteriormente puede mantenerse, por ejemplo, como un polvo humectable, gránulo humectable, concentrado emulsionable, concentrado en suspensión, microemulsión, suspensión de cápsulas, microcápsula seca, pastilla o gel, o suspenderse, dispersarse, emulsionarse

o ponerse de otro modo en un medio líquido adecuado (tal como agua u otro medio acuoso, orgánico o aceitoso adecuado) de manera que se proporcione una composición líquida (concentrada) de la invención que tiene una estabilidad que permite que la composición de la invención se almacene adecuadamente o (donde sea necesario después de la dilución adicional) se aplique a las semillas. Preferentemente, la composición para el tratamiento de semillas está en forma de un polvo humectable o gránulos dispersables en agua, una disolución fluida, una emulsión o concentrado en emulsión, una suspensión o concentrado en suspensión, o una suspensión de cápsulas o concentrado de suspensión de cápsulas. Preferentemente, la composición para el tratamiento de semillas de la invención puede transportarse y/o almacenarse antes del uso final, opcionalmente (y normalmente preferentemente) como un concentrado líquido adecuado, polvo seco, pastilla, suspensión de cápsulas, suspensión o "torta húmeda", que puede ser adecuadamente diluida, dispersada, suspendida, emulsionada o reconstituida de otro modo adecuadamente en un disolvente adecuado, preferentemente agua, antes de la aplicación a la semilla. La composición para el tratamiento de semillas según la invención permite ser aplicada a la semilla usando cualquier técnica manual o mecánica adecuada o deseada tal como pulverización, vertido, inmersión, empapamiento, desinfección, recubrimiento, incrustación, granulación, o cualquier otra técnica adecuada.

En una realización preferida, las proteínas de unión a semilla presentes en la composición para el tratamiento de semillas de la invención son capaces de unir el agente de potenciamiento de planta o la combinación de agentes de potenciamiento de planta presente en la composición de la invención sobre la semilla. "Capaz de unir un agente de potenciamiento de planta sobre una semilla de planta", como se usa en este documento, significa que la proteína de unión a semilla se une de tal forma a la semilla de planta que puede hacer que el agente de potenciamiento de planta se adhiera firmemente a la semilla de planta, mientras que no hace que el agente de potenciamiento de planta se adhiera a un recipiente de almacenamiento, a equipo de aplicación o al equipo de siembra. Con el fin de ser capaz de unir un agente de potenciamiento de planta sobre una semilla de planta, tanto una única proteína de unión a semilla como múltiples, tanto si están comprendidas en un agente de direccionamiento como se define adicionalmente como si no, se acoplan al agente de potenciamiento de planta, tanto por un enlace covalente, por enlaces de hidrógeno, por interacciones dipolo- dipolo, por fuerzas de van der Waals débiles, como por cualquier combinación de lo anterior, produciendo la unión de la una o más proteínas de unión a semilla acopladas al agente de potenciamiento de planta a la semilla de planta.

Cuando se une el agente de potenciamiento de planta o la combinación de agentes de potenciamiento de planta específicamente a la semilla, la proteína de unión a semilla o proteínas de unión a semilla reducen la abrasión y despolvado de la composición para el tratamiento de semillas de las semillas tratadas y/o reducen la adhesividad de las semillas tratadas y, por tanto reducen las probabilidades de aglomeración de semillas o la adhesividad a la pared de recipientes de almacenamiento o del equipo de manipulación o plantación o de siembra de semillas. Preferentemente, la proteína de unión a semilla o proteínas de unión a semilla presentes en la composición para el tratamiento de semillas según la invención no inducen la germinación de la semilla de planta, ni retrasan o inhiben la germinación de la semilla de planta. Preferentemente, la proteína de unión a semilla o proteínas de unión a semilla presentes en la composición para el tratamiento de semillas según la invención no son fitotóxicas, lo que significa que no interfieren con la germinación o desarrollo de la planta de semillero o planta emergente.

En otra realización preferida, la proteína de unión a semilla es capaz de unir un vehículo sobre una semilla de planta. Un "vehículo", como se usa en este documento, significa cualquier vehículo sólido, semisólido o líquido en o sobre el que una sustancia puede ser adecuadamente incorporada, incluida, inmovilizada, adsorbida, absorbida, unida, encapsulada, integrada, unida o comprendida. En una realización específica, la semilla de planta puede estar completamente envuelta por un vehículo. Ejemplos no limitantes de tales vehículos incluyen nanocápsulas, microcápsulas, nanoesferas, microesferas, nanopartículas, micropartículas, liposomas, vesículas, perlas, un gel, partículas de resina iónica débil, liposomas, vehículos de administración de cocleato, gránulos pequeños, granulados, nanotubos, fulerenos, gotitas de agua que son parte de una emulsión de agua en aceite, gotitas de aceite que son parte de una emulsión de aceite en agua, materiales orgánicos tales como corcho, madera u otros materiales derivados de planta (por ejemplo, en forma de vainas de semilla, astillas de madera, pulpa, esferas, perlas, hojas o cualquier otra forma adecuada), papel o cartón, materiales inorgánicos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina, silicatos y zeolitas, o incluso células microbianas (tales como células de levadura) o fracciones o fragmentos adecuados de las mismas. "Capaz de unir un vehículo sobre una semilla de planta", como se usa en este documento, significa que la unión de la proteína de unión a semilla a la semilla de planta es lo suficientemente fuerte como para unir, más preferentemente para retener, un vehículo a dicha semilla de planta; dependiendo del tamaño del vehículo y de la afinidad de la proteína de unión a semilla, una o más proteínas de unión a semilla pueden unirse a una o más moléculas presentes en la semilla de planta y cooperar de forma que la avidéz resultante de las proteínas de unión a semilla por el (los) sitio(s) de unión garantice la fuerte unión del vehículo, preferentemente retenga el vehículo, sobre la semilla de planta. "Retener", como se usa en este documento, significa que la fuerza de unión resultante de la afinidad o avidéz de cualquier proteína de unión a semilla individual o una combinación de dos o más proteínas de unión a semilla por su molécula diana es mayor que la fuerza combinada y el par de fuerzas impuesto por la gravedad del vehículo y la fuerza y el par de fuerzas, si lo hay, impuesto por las fuerzas de cizallamiento producidas por uno o más factores externos. En una realización preferida, dicho factor externo es la abrasión que se produce durante el tratamiento de semillas o la manipulación de semillas.

Una ventaja particular de unir un vehículo por unión específica con respecto a la unión no específica es que la unión específica es más resistente a las fuerzas de cizallamiento externas aplicadas al vehículo (Cozens-Roberts et al., 1990). Preferentemente, la "retención" puede evaluarse por el hecho de que el contacto entre el vehículo y la semilla es mejor (expresada en la duración del contacto, número de vehículos por semilla, o distancia entre el vehículo y la semilla) para un vehículo con una proteína de unión al antígeno, en comparación con un vehículo sin dicha proteína de unión al antígeno, cuando se aplica bajo condiciones idénticas. En una realización preferida, el vehículo unido sobre la semilla de planta por medio de una o más proteínas de unión a semilla, seguirá unido durante un periodo más largo a la semilla de planta que el mismo vehículo sin la(s) proteína(s) de unión a semilla.

Preferentemente, el agente de potenciamiento de planta o la combinación de agentes de potenciamiento de planta, como se ha definido anteriormente, está comprendido en un vehículo. Preferentemente, dicho vehículo es un microvehículo. Un "microvehículo", como se usa en este documento, es un vehículo en partículas donde las partículas tienen menos de 500 µm de diámetro, preferentemente menos de 250 µm, incluso más preferible menos de 100 µm, lo más preferentemente menos de 50 µm. Como se usa en este documento, microvehículo, micropartícula, microesfera, microcápsula, nanopartícula, nanocápsula y nanoesfera pueden usarse indistintamente. Microvehículos para la administración de sustancias activas agroquímicas (como se definen más adelante) se han descrito, entre otros, en los documentos US6180141, WO2004004453, WO2005102045 y US7494526.

Las características de microvehículos pueden ser de forma que permitan la liberación lenta de la sustancia activa agroquímica, liberación retardada del agroquímico o liberación inmediata del agroquímico, todos los tipos de microvehículos tienen su uso específico. Los microvehículos pueden comprender naturalmente residuos reticulables adecuados para la unión covalente o los microvehículos pueden derivatizarse para introducir grupos reticulables adecuados a los métodos muy conocidos en la técnica. Tal derivatización puede producirse antes de la fabricación del microvehículo, es decir, al nivel de las materias primas que se usarán en dicho proceso de fabricación, puede producirse durante el proceso de fabricación del microvehículo, o puede producirse posterior a la fabricación del microvehículo. En una realización específica, grupos funcionales sobre el microvehículo pueden unirse a un agente de enlace o espaciador, que está a su vez unido a una proteína de unión a semilla como se ha definido anteriormente.

Preferentemente, la proteína de unión a semilla se acopla al agente de potenciamiento de planta o al vehículo. "Acoplado", como se usa aquí, puede ser cualquier acoplamiento que permita la retención del agente de potenciamiento de planta o vehículo que contiene el agente de potenciamiento de planta por la proteína de unión a semilla; puede ser un enlace covalente, además de uno no covalente, por enlaces de hidrógeno, por interacciones dipolo-dipolo, por fuerzas de van der Waals débiles o por cualquier combinación de las anteriores. Preferentemente, dicho acoplamiento es un enlace covalente. Es evidente para el experto en la materia cómo las proteínas de unión a semilla pueden acoplarse a cualquier tipo de grupos funcionales presentes en la superficie externa de un vehículo. "Grupo funcional", como se usa en este documento, significa cualquier grupo químico al que una proteína puede unirse covalentemente, que incluye, pero no se limita a, grupo carboxilo, amina, hidroxilo, sulfhidrilo o alquino. Como ejemplo no limitante, puede aplicarse acoplamiento formando un enlace carbodiimida entre grupos carboxilo sobre la superficie externa del vehículo y los grupos amina de la proteína de unión a semilla. Pueden acoplarse proteínas de unión a semilla con o sin agentes de enlace al vehículo. En el caso de una célula microbiana o fago, la proteína de unión a semilla según la invención puede ser codificada por la célula microbiana o genoma de fago, mientras que el agente de potenciamiento de planta está contenido en o acoplado a la célula microbiana o fago, tanto como una proteína de fusión como por enlace químico. Un "agente de enlace", como se usa aquí, puede ser cualquier agente de enlace conocido para el experto en la materia; preferentemente el agente de enlace está aumentando la flexibilidad de la(s) proteína(s) de unión a semilla, tanto si está comprendido como si no en un agente de direccionamiento (como se define adicionalmente) unido sobre el vehículo, facilitando así la unión de la(s) proteína(s) de unión a semilla a la semilla de planta. Ejemplos de tales agentes de enlace pueden encontrarse en los documentos WO0024884 y WO0140310.

Cuando se une el vehículo que comprende un agente de potenciamiento de planta o una combinación de agentes de potenciamiento de planta específicamente a la semilla, la proteína de unión a semilla o proteínas de unión a semilla reducen preferentemente la abrasión y el despolvo de la composición para el tratamiento de semillas de las semillas tratadas y, por tanto, reducen las pérdidas de agentes de potenciamiento de planta comprendidos en el vehículo.

Preferentemente, la proteína de unión a semilla según la invención es una proteína de unión al antígeno. Una "proteína de unión al antígeno", como se usa en este documento, significa el todo o parte de una molécula proteínica (proteína, similar a proteína o que contiene proteína) que es capaz de unirse usando interacciones intermoleculares específicas a una molécula diana. Un "antígeno", como se usa en este documento, es una molécula capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un animal. Una proteína de unión al antígeno puede estar basada en inmunoglobulina o puede basarse en dominios presentes en proteínas, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas microbianas, inhibidores de proteasas, toxinas, fibronectina, lipocalinas, proteínas de bobina en espiral antiparalelas monocatenarias o proteínas de motivo de repetición. Ejemplos no limitantes de tales proteínas de unión al antígeno son proteínas de unión al antígeno de hidrato de carbono (CBD) (Blake et al, 2006), anticuerpos de cadena pesada (hcAb), anticuerpos de un solo dominio (sdAb), minicuerpos (Tramontano et al., 1994), el dominio variable de anticuerpos de cadena pesada de camélido (VHH), el dominio variable de los nuevos receptores de

antígeno (VNAR), afucuerpos (Nygren et al., 2008), alfacuerpos (documento WO2010066740), dominios de repetición de anquirina diseñados (DARPin) (Stumpp et al., 2008), anticalinas (Skerra et al., 2008), knottinas (Kolmar et al., 2008) y dominios CH2 manipulados (nanoanticuerpos; Dimitrov, 2009). Preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno consiste en una única cadena de polipéptidos y no se modifica pos-traduccionalmente. Más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno se deriva de un sistema inmunitario innato o adaptativo. Todavía más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno se deriva de una inmunoglobulina. Lo más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones determinantes de la complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de la misma (que entonces normalmente contendrá al menos algunos de los restos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad). Preferentemente, una proteína de unión al antígeno es fácil de producir con alto rendimiento, preferentemente en un sistema de expresión recombinante microbiano, y conveniente de aislar y/o purificar posteriormente. También preferentemente, una proteína de unión al antígeno es estable, tanto durante el almacenamiento como durante la utilización, lo que significa que la integridad de la proteína de unión al antígeno se mantiene en condiciones de almacenamiento y/o utilización, o se recupera después de las condiciones de almacenamiento y/o utilización, que pueden incluir temperaturas elevadas, ciclos de congelación-descongelación, cambios en el pH o en la fuerza iónica, irradiación UV, presencia de productos químicos perjudiciales y similares. Más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno es estable en una formulación agroquímica como se define más adelante. Lo más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno sigue siendo estable en una formulación agroquímica (como se define adicionalmente) cuando se almacena a temperatura ambiente durante un periodo de hasta dos años o cuando se almacena a 54 °C durante un periodo de al menos dos semanas. Preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno está seleccionada del grupo que consiste en DARPin, knottinas, alfacuerpos y VHH. Más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno está seleccionada del grupo que consiste en alfacuerpos y VHH. Lo más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno es un VHH.

La unión de la proteína de unión al antígeno a una molécula diana sobre una semilla de planta se produce con alta afinidad: normalmente, la constante de disociación de la unión entre la proteína de unión al antígeno y la molécula diana sobre la semilla es inferior a  $10^{-5}$  M, más preferentemente la constante de disociación es inferior a  $10^{-6}$  M, incluso más preferentemente la constante de disociación es inferior a  $10^{-7}$  M, lo más preferentemente la constante de disociación es inferior a  $10^{-8}$  M. Preferentemente, la unión de la proteína de unión al antígeno a su molécula diana sobre el sitio de semilla es específica, lo que significa que la proteína de unión al antígeno se une preferencialmente a un antígeno particular que está presente en una mezcla homogénea o heterogénea de diferentes antígenos. La especificidad de unión de una proteína de unión al antígeno puede analizarse por métodos tales como ELISA, como se describe en el Ejemplo 2, en el que la unión de la proteína de unión al antígeno a su molécula diana se compara con la unión de la proteína de unión al antígeno a una molécula no relacionada y con la adhesión no específica de la proteína de unión al antígeno al recipiente de reacción. En ciertas realizaciones, una interacción de unión específica discriminará entre antígenos deseables y no deseables en una muestra, en algunas realizaciones más de aproximadamente 10 a 100 veces o más (por ejemplo, superior a aproximadamente 1000 o 10.000 veces). La unión de la proteína de unión al antígeno puede ser específica para semillas de una especie de planta particular, lo que significa que la molécula diana, presente en o sobre las semillas de tal especie de planta, no está presente o está presente a un grado mucho menor en o sobre semillas de otra especie de planta; o la unión puede ser más general para semillas de más de una especie de planta, si la molécula diana está presente en o sobre semillas de más de una especie de planta. La unión de la proteína de unión al antígeno puede ser específica para una parte particular o lado de la semilla de planta, lo que significa que la molécula diana, presente en o sobre tal parte o lado de la semilla de planta, no está presente o está presente a un grado mucho menor sobre otras partes o lados de la semilla de planta, o la unión puede ser más general para el total de la semilla de planta, si el sitio de unión está presente sobre la semilla de planta entera.

Preferentemente, la unión de la proteína de unión al antígeno al sitio de unión es todavía funcional bajo condiciones rigurosas, tales como temperatura baja o alta, pH bajo o alto, fuerza iónica baja o alta, irradiación UV, bajo contenido de humedad, bajo potencial del agua, presencia de productos químicos desnaturizantes, o similares. En una realización preferida, dichas condiciones rigurosas se definen por un intervalo de pH de 4 a 9, más preferentemente por un intervalo de pH de 3 a 10, incluso más preferentemente por un intervalo de pH de 2 a 10, lo más preferentemente por un intervalo de pH de 1 a 11. En otra realización preferida, dichas condiciones rigurosas se definen por un intervalo de temperatura de 4-50 °C, más preferentemente un intervalo de temperatura de 0-55 °C, incluso más preferentemente un intervalo de temperatura de 0-60 °C. En otra realización preferida, dichas condiciones rigurosas se definen por un contenido de humedad inferior al 50 %, preferentemente un contenido de humedad inferior al 40 %, más preferentemente un contenido de humedad inferior al 30 %, incluso más preferentemente un contenido de humedad inferior al 25 %, lo más preferentemente un contenido de humedad inferior al 20 %. En otra realización preferida más, dichas condiciones rigurosas se definen por un potencial del agua inferior a -0,5 MPa, preferentemente un potencial del agua inferior a -0,75 MPa, más preferentemente un potencial del agua inferior a -1 MPa, incluso más preferentemente un potencial del agua inferior a -1,5 MPa, lo más preferentemente un potencial del agua inferior a -2 MPa. En otra realización preferida adicional, dichas condiciones rigurosas se definen como condiciones predominantes en métodos para el tratamiento de semillas como se define adicionalmente.

Preferentemente, la unión a la semilla de planta de la proteína de unión a semilla, preferentemente la proteína de unión al antígeno presente en la composición para el tratamiento de semillas según la invención, no interfiere con la germinación de la semilla, es decir, la unión de la proteína de unión al antígeno a la semilla de planta no induce la germinación de la semilla, ni produce el retraso o inhibición de la germinación de la semilla de planta.

5 Preferentemente, la unión de la proteína de unión al antígeno a la semilla de planta no es fitotóxica, lo que significa que la unión de la proteína de unión al antígeno a la semilla de planta no interfiere negativamente con la germinación sana y el desarrollo de la semilla, planta de semillero o planta emergente.

En una realización preferida, la proteína de unión a semilla, preferentemente la proteína de unión al antígeno presente en la composición para el tratamiento de semillas según la invención, se une a un componente de la pared celular de planta. Un “componente de la pared celular de planta”, como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula que se produce en la laminilla media, pared celular primaria o secundaria de plantas superiores y contribuye a la estructura de la pared celular de planta. La laminilla media es compartida por células vecinas y las cementa firmemente juntas; la laminilla media es rica en pectina. Los principales componentes químicos de la pared celular de planta primaria incluyen celulosa. Además, la pared celular primaria contiene dos grupos de polisacáridos ramificados, las pectinas y los glucanos de reticulación. Organizados en una red con las microfibrillas de celulosa, los glucanos de reticulación aumentan la resistencia a la tracción de la celulosa, mientras que la coextensiva red de pectinas provee a la pared celular de la capacidad para resistir a la compresión. Además de estas redes, una pequeña cantidad de proteína puede encontrarse en todas las paredes celulares primarias de planta. La pared celular de planta secundaria, que frecuentemente se deposita dentro de la pared celular primaria a medida que madura una célula, tiene algunas veces una composición casi idéntica a la de la pared primaria desarrollada antes. Más comúnmente, sin embargo, sustancias adicionales, especialmente lignina, se encuentran en la pared celular secundaria. Además lignina, cutina, suberina, y otros materiales cerosos, se encuentran algunas veces en las paredes celulares de planta. Preferentemente, dicha proteína de unión a semilla, más preferentemente dicha proteína de unión al antígeno presente en la composición para el tratamiento de semillas según la invención, se une a un componente de la pared celular de planta elegido del grupo que consiste en celulosa, hemicelulosa, polisacáridos pécticos, proteínas, lignina, suberina, cutina o cera. Más preferentemente, dicha proteína de unión a semilla, más preferentemente dicha proteína de unión al antígeno presente en la composición para el tratamiento de semillas según la invención, se une a un componente de la pared celular de planta elegido del grupo que consiste en hemicelulosa, polisacáridos pécticos, lignina, suberina o cutina. Lo más preferentemente, dicha proteína de unión a semilla, más preferentemente dicha proteína de unión al antígeno presente en la composición para el tratamiento de semillas según la invención, se une a un polisacárido péctico.

Preferentemente, la proteína de unión a semilla, más preferentemente la proteína de unión al antígeno presente en la composición para el tratamiento de semillas según la invención, se une a un polisacárido. “Polisacáridos”, como se usa aquí, son estructuras de hidrato de carbono poliméricas, formadas de unidades de repetición de monosacáridos, unidos juntos por enlaces glucosídicos, que incluyen homopolisacáridos y heteropolisacáridos, pero que excluyen estructuras mixtas con unidades no de hidrato de carbono tales como glucoproteínas y lipoproteínas. Preferentemente, dichos polisacáridos no están contaminados con otros compuestos, y tienen una pureza de al menos el 85 % en peso/peso, preferentemente el 90 % en peso/peso, más preferentemente el 95 % en peso/peso, incluso más preferentemente el 98 % en peso/peso, lo más preferentemente el 99 % en peso/peso. Más de un tipo de monosacáridos puede estar presente en un polisacárido. En algunos casos, la unidad de repetición puede contener ligeras modificaciones. Los homopolisacáridos son polisacáridos donde todas las unidades de repetición son del mismo tipo de monosacárido; cuando más de un monosacárido está presente, el polisacárido se clasifica como heteropolisacárido. Las estructuras pueden ser lineales o ramificadas, hasta estructuras con una alta complejidad. Preferentemente, dicha proteína de unión a semilla, más preferentemente dicha proteína de unión al antígeno presente en la composición para el tratamiento de semillas según la invención, se une a un heteropolisacárido.

Los polisacáridos se distinguen de los oligosacáridos por su tamaño, complejidad y grado de polimerización. Los polisacáridos como se usa aquí comprenden al menos 10 unidades de monosacárido, preferentemente al menos 15 unidades de monosacárido. Preferentemente, dicho polisacárido es un polisacárido estructural. Los polisacáridos estructurales son conocidos para el experto en la materia; los polisacáridos estructurales desempeñan una función en la rigidez de un organismo, o una parte del mismo, e incluyen, pero no se limitan a, celulosa, glucano, xilano y pectina. En una realización preferida, dicho polisacárido estructural se deriva de una planta.

“Unión a un polisacárido”, como se usa aquí, significa que la proteína de unión a semilla, preferentemente la proteína de unión al antígeno presente en la composición para el tratamiento de semillas según la invención, se une a la estructura de polisacárido, preferentemente sin reacción cruzada con los oligosacáridos, como puede medirse usando una micromatriz de hidratos de carbono que comprende polisacáridos, y oligosacáridos relacionados (Øbro et al., 2009).

En otra realización preferida, la proteína de unión a semilla, más preferentemente la proteína de unión al antígeno presente en la composición para el tratamiento de semillas según la invención, se une a pectina, lo más preferentemente dicha pectina comprende un homogalacturonano de baja esterificación. La pectina comprende un grupo heterogéneo de polisacáridos complejos, que comparten la presencia de ácido D-galacturónico unido en  $\alpha$ -(1-4) en el esqueleto, pero que se diferencian además en composición, enlace y enlaces intermoleculares.



Normalmente, se distinguen tres tipos de polisacáridos pécticos: (1) homogalacturonano (HG), que consiste en cadenas lineales de ácido D-galacturónico unido en  $\alpha$ -(1-4), (2) ramnogalacturonano I (RG-I) que comprende la unidad de repetición  $\alpha$ -D-galacturónico - (1,2) -  $\alpha$  - L - ramnosa - (1- y (3) ramnogalacturonano II (RG-II) con un esqueleto de ácido D-galacturónico altamente ramificado. Algunos de los grupos carboxilo de los restos galacturónicos están esterificados, principalmente como éster metílico; el grado de esterificación puede variar del 0-90 %. La pectina en la que menos del 50 % de los grupos carboxilo están esterificados normalmente se clasifica como "de baja esterificación". El grado de esterificación determina fuertemente las propiedades físicas y químicas de la pectina.

En otra realización preferida adicional, dicha proteína de unión a semilla, más preferentemente dicha proteína de unión al antígeno presente en la composición para el tratamiento de semillas según la invención, comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones determinantes de la complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de las mismas (que entonces normalmente contendrá al menos algunos de los restos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad). Más preferentemente, dicha proteína de unión a semilla, más preferentemente dicha proteína de unión al antígeno presente en la composición para el tratamiento de semillas según la invención, se deriva de un anticuerpo de camélido de cadena pesada, incluso más preferentemente dicha proteína de unión al antígeno comprende una secuencia de VHH. Los anticuerpos de camélido de cadena pesada, y las secuencias derivadas de VHH, son conocidos para el experto en la materia. Se han descrito anticuerpos de camélido, entre otros, en el documento WO9404678 y en el documento WO2007118670. Lo más preferentemente, dicho VHH comprende, preferentemente consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 - SEQ ID N°11 (VHH 6B5, 6D7, 6D11, 6F2, 6H4, 7A5, 7A7, 7E9, 8A4, 8D6 y 12C3), o cualquier fragmento adecuado de la misma (que entonces normalmente contendrá al menos algunos de los restos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad) u homólogos de la misma. Homólogos, como se usa aquí, son secuencias en las que cada una o cualquier región estructural y cada una o cualquier región determinante de la complementariedad muestra al menos el 80 % de identidad, preferentemente al menos el 85 % de identidad, más preferentemente el 90 % de identidad, incluso más preferentemente el 95 % de identidad con la región correspondiente en la secuencia de referencia (es decir, FR1\_homólogo frente a FR1\_referencia, CDR1\_homólogo frente a CDR1\_referencia, FR2\_homólogo frente a FR2\_referencia, CDR2\_homólogo frente a CDR2\_referencia, FR3\_homólogo frente a FR3\_referencia, CDR3\_homólogo frente a CDR3\_referencia y FR4\_homólogo frente a FR4\_referencia) como se mide en un alineamiento de BLASTp (Altschul et al., 1997; definiciones de FR y CDR según Kabat).

En otra realización preferida adicional, la semilla de planta es una semilla de un cultivo. "Cultivo" o un "cultivo comercial", como se usa en este documento, significa una especie de planta o variedad que se cultiva para ser recogida como alimento, forraje para ganado, materia prima para combustible, o para cualquier otro fin económico. Como ejemplo no limitante, dichos cultivos pueden ser maíz, cereales, tales como trigo, centeno, cebada y avena, sorgo, arroz, remolacha azucarera y remolacha forrajera, fruta, tal como fruta de pepita (por ejemplo, manzanas y peras), fruta cítrica (por ejemplo, naranjas, limones, limas, pomelo o mandarinas), fruta de hueso (por ejemplo, melocotones, nectarinas o ciruelas), frutos secos (por ejemplo, almendras o nueces), fruta blanda (por ejemplo, cerezas, fresas, moras o frambuesas), la familia de plátanos o vides, cultivos leguminosos, tales como judías, lentejas, guisantes y soja, cultivos de aceite, tales como girasol, alazor, colza, canola, ricino u oliva, cucurbitáceas, tales como pepinos, melones o calabazas, plantas de fibra, tales como algodón, lino o cáñamo, cultivos para combustible, tales como caña de azúcar, miscanto o pasto varilla, verduras, tales como patatas, tomates, pimientos, lechuga, espinaca, cebollas, zanahorias, berenjenas, espárrago o col, ornamentales, tales como flores (por ejemplo, petunias, pelargonios, rosas, tulipanes, lirios o crisantemos), arbustos, árboles de hoja ancha (por ejemplo, álamos o sauces) y árboles de hoja perenne (por ejemplo, coníferas), hierbas, tales como césped, pasto o pasto forrajero, u otras plantas útiles, tales como plantas de café, té, tabaco, lúpulo, pimienta, caucho o látex. Preferible, el cultivo está seleccionado del grupo que consiste en maíz, trigo, sorgo, centeno, soja, arroz, algodón, canola, girasol, remolacha azucarera, patatas, verduras, flores, pasto y pasto forrajero.

La invención también engloba un método de fabricación de una composición para el tratamiento de semillas según la invención, comprendiendo dicho método (i) seleccionar al menos una proteína de unión a semilla según la invención, preferentemente más proteínas de unión a semilla según la invención, tanto si están comprendidas como si no en un agente de direccionamiento como se define adicionalmente, y (ii) acoplar dicha(s) proteína(s) de unión a semilla a un agente de potenciamiento de planta o una combinación de agentes de potenciamiento de planta, y opcionalmente (iii) añadir adicionalmente componentes que pueden ser adecuados para composiciones para el tratamiento de semillas (tales como aditivos de humectación y dispersión, espesantes, agentes colorantes, agentes antiespumantes, adhesivos, vehículos sólidos y/o disolventes) como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, dicho agente de potenciamiento de planta está comprendido en un vehículo, más preferentemente, dicha(s) proteína(s) de unión a semilla se acoplan al vehículo, que comprende el agente de potenciamiento de planta.

Un segundo aspecto de la invención es un método de tratamiento de una semilla de planta, comprendiendo dicho método (1) preparar una composición para el tratamiento de semillas según la invención y (2) aplicar dicha composición a la semilla.

Métodos de aplicación de una composición para el tratamiento de semillas a una semilla son conocidos para el experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, desinfección de semillas, empapamiento de semillas,

recubrimiento de semillas, recubrimiento de película, recubrimiento multicapa, incrustación, formación de pellas, granulación, o cualquier combinación de los anteriores. El método de tratamiento de una semilla de la invención implica aplicar a una semilla individual o a más semillas simultáneamente una composición para el tratamiento de semillas según la invención usando cualquiera de los métodos para el tratamiento de semillas que se ha descrito anteriormente. La composición para el tratamiento de semillas de la invención puede usarse como tal, o puede primero diluirse en un disolvente adecuado, preferentemente agua, antes ser aplicado a una o más semillas. La composición de la invención puede pulverizarse, rociarse o verterse sobre las semillas o las semillas pueden ser empapadas o sumergidas en una composición para el tratamiento de semillas usando equipo adecuado y técnicas que incluyen, pero no se limitan a, recubridoras de tambor, técnicas en lecho fluidizado, recubridoras giratorias, tratadoras de semillas roto-estáticas, métodos de molienda con molino, cubas ventiladas lateralmente, mezcladoras de volteo, lechos de borboteo y similares. Las semillas pueden tratarse a medida que se recogieron, pero las semillas pueden también recibir cualquier tipo de pretratamiento antes de ser tratadas con una composición para el tratamiento de semillas. Pretratamientos adecuados incluyen, pero no se limitan a, limpieza, clasificación de las semillas por tamaño, peso, densidad o por potencia de germinación, desinfección o desinfección de las semillas, y/o acondicionamiento o pregerminación de las semillas, por métodos tales como empapar las semillas en agua y secarlas otra vez o por osmoacondicionamiento u otros métodos adecuados. Las semillas pueden tratarse en cualquier momento entre la recogida y la siembra o plantación de la semilla. Normalmente, las semillas se tratan antes de la siembra o plantación de las semillas con una composición para el tratamiento de semillas y se secan después del tratamiento para permitir el almacenamiento durante periodos prolongados. Alternativamente, las semillas pueden tratarse inmediatamente antes de la siembra o plantación, por ejemplo, puede aplicarse una desinfección de semillas a semillas de cereal inmediatamente antes de continuar con la siembra, o puede aplicarse una composición para el tratamiento de semillas a semillas de arroz en el momento en el que se preempapan en agua antes ser sembradas en los arrozales. Todavía de otro modo, una composición para el tratamiento de semillas puede aplicarse a las semillas o a la vecindad inmediata de las semillas simultáneamente con la siembra o plantación, y para hacer esto pueden utilizarse dispositivos y métodos especiales, tales como los descritos en los documentos WO98/25445 y WO2006/112700.

Preferentemente, el método de tratamiento de las semillas es tal que no daña las semillas, ni degrada o inactiva la sustancia activa agroquímica o agente de potenciación de planta comprendido en su interior. En otra realización preferida, el método de tratamiento de las semillas es tal que no induce la germinación de las semillas, ni retrasa o inhibe la germinación de las semillas. Preferentemente, el método de tratamiento de las semillas es tal que produce una distribución uniforme de la composición para el tratamiento de semillas sobre las semillas, o, alternativamente, que produce una distribución muy específica de la composición para el tratamiento de semillas sobre la superficie de la semilla, por ejemplo predominantemente en el sitio de germinación de la semilla. Incluso más preferentemente, el método es tal que permite la unión de la(s) proteína(s) de unión a semilla, más preferentemente la(s) proteína(s) de unión al antígeno presente(s) en la composición para el tratamiento de semillas de unión a las semillas.

Un tercer aspecto de la invención es una semilla de planta tratada con una composición que comprende al menos una proteína de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones complementarias o cualquier fragmento adecuado de las mismas (que entonces normalmente contendrá al menos algunos de los restos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad).

Dicha proteína de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones complementarias, o cualquier fragmento adecuado de las mismas, se une preferentemente específicamente a la semilla de planta, más preferentemente, como resultado, es capaz de unir un agente de potenciación de planta o una combinación de agentes de potenciación de planta (como se define antes), tanto si están comprendidos como si no en un vehículo, a una semilla de planta. Sin embargo, también se prevé que dicha proteína de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones complementarias, o cualquier fragmento adecuado de las mismas, que está comprendido en la composición para el tratamiento de semillas, pueda también actuar como sustancia activa agroquímica (como se define adicionalmente) por sí misma. De hecho, una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones complementarias, o cualquier fragmento adecuado de las mismas, puede ser antifúngica (por ejemplo, interfiriendo con el crecimiento fúngico), insecticida o nematocida (por ejemplo, inhibiendo la actividad de enzimas digestivas cruciales) por sí misma como ejemplos no limitantes.

Preferentemente, dicha composición para el tratamiento de semillas, que comprende al menos una proteína de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones complementarias o cualquier fragmento adecuado de las mismas, es una composición según la invención. Más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno se deriva de un anticuerpo de camélido de cadena pesada, incluso más preferentemente dicha proteína de unión al antígeno comprende una secuencia de VHH, lo más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno es un VHH seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 – SEQ ID N° 11, o cualquier fragmento adecuado del mismo (que entonces normalmente contendrá al menos algunos de los restos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad) u homólogos del mismo.

El tratamiento de la semilla de planta con una composición según la invención puede producirse en cualquier momento antes de, inmediatamente antes o durante la siembra de la semilla, usando cualquiera de los métodos descritos antes.

5 En una realización preferida, una semilla así tratada con una composición según la invención y/o la planta de  
 semillero que emerge de la semilla tratada y/o una semilla sembrada en la vecindad inmediata de la semilla así  
 tratada con una composición según la invención, y/o la planta de semillero que emerge de la semilla sembrada en la  
 vecindad inmediata de la semilla así tratada con una composición según la invención, se protege de patógenos  
 10 transmitidos por semilla y/o patógenos transmitidos por la tierra. "Patógenos transmitidos por semilla", como se usa  
 en este documento, significa patógenos que producen enfermedad de la planta mediante un objeto biológico (por  
 ejemplo, espora, micelio, esclerotio, células) que es capaz de infectar al huésped y que es llevado con, sobre la  
 superficie de o dentro de la semilla de planta. Ejemplos de patógenos transmitidos por semilla incluyen hongos (por  
 ejemplo, *Tilletia tritici*, *Ustilago nuda*), bacterias (por ejemplo, *Pseudomonas syringae*) o virus (por ejemplo, virus del  
 15 mosaico de la lechuga). "Patógenos transmitidos por la tierra", como se usa en este documento, significa patógenos  
 que producen enfermedad de la planta mediante un objeto biológico (por ejemplo, espora, micelio, esclerotio,  
 células) que es capaz de infectar al huésped y que llega a la planta mediante la tierra. Ejemplos de patógenos  
 transmitidos por la tierra incluyen hongos (por ejemplo, *Rhizoctonia solani*), bacterias (por ejemplo, *Erwinia*), virus  
 (por ejemplo, virus del amarilleo necrótico de la lechuga) y nematodos (por ejemplo, *Meloidogyne*). "Protegido de  
 patógenos transmitidos por semilla y/o transmitidos por la tierra", como se usa en este documento, significa que la  
 20 semilla tratada o la planta de semillero que emerge de la semilla tratada no son afectadas o a un grado mucho  
 menor por patógenos transmitidos por semilla y/o transmitidos por la tierra en comparación con semillas o plantas de  
 semillero que emergen de las mismas a las que no se aplicó la composición según la invención. "Vecindad  
 inmediata", como se usa en este documento, significa dentro de una distancia de 10 cm o menos de la semilla  
 tratada, preferentemente dentro de una distancia de 5 cm o menos de la semilla tratada, más preferentemente  
 25 dentro de una distancia de 2 cm o menos de la semilla tratada, lo más preferentemente dentro de una distancia de 1  
 cm o menos de la semilla tratada.

Una semilla así tratada con una composición según la invención se beneficiará de la unión de alta afinidad a la  
 semilla de las proteínas de unión a semilla, preferentemente las proteínas de unión al antígeno, acopladas al (a los)  
 agente(s) de potenciamiento de planta, tanto si están comprendidas como si no en un vehículo, presente en la  
 composición para el tratamiento de semillas, que puede producir periodos prolongados de protección de las semillas  
 30 de patógenos transmitidos por semilla y/o transmitidos por la tierra y/o cantidades reducidas de agente de  
 potenciamiento de planta que necesitan estar presentes en la composición para el tratamiento de semillas con el fin  
 de proporcionar protección adecuada de la semilla tratada de patógenos transmitidos por semilla y/o transmitidos por  
 la tierra en comparación con semillas sin aplicación de la composición según la invención. Preferentemente, el  
 agente de potenciamiento de planta se elige del grupo que comprende fungicidas, nematicidas, insecticidas,  
 35 bactericidas o viricidas. Ejemplos de sustancias activas agroquímicas adecuadas para tratar patógenos transmitidos  
 por semilla y por la tierra incluyen, pero no se limitan a, captan, tiram, metalaxilo, fludioxonilo, difenoconazol,  
 iprodiona, tebuconazol, carboxina, miclobutanilo, flutriafol, triadimenol, triticonazol, imizalilo, bitertanol,  
 fluoxastrobina, azoxistrobina, pencicuron, triazóxido, mancozeb y PCNB como fungicidas, terbufos, clorpirifos,  
 fipronilo, cloretoxifos, teflutrina, carbofurano, tebupirimifos, imidacloprid, tiometoxam, cipermetrina, triflumurón,  
 40 clorantraniliproles y metiocarb como insecticidas, abamectina, tiodicarb y aldoxicarb como nematicidas y  
 estreptomycin, penicilina, tetraciclina, ampicilina y ácido oxolínico como bactericidas. También preferentemente,  
 la semilla se trata con una composición para el tratamiento de semillas que comprende uno o una combinación de  
 agentes de potenciamiento de planta, que están comprendidos en una composición para la liberación lenta o  
 retardada, que es particularmente ventajoso para semillas de siembra en otoño, que requieren periodos prolongados  
 45 de protección contra patógenos transmitidos por la tierra, en particular contra patógenos que se producen en el  
 invierno bajo la cubierta de nieve, tal como el moho de la nieve que afecta a las semillas de centeno.

En otra realización preferida, una planta de semillero que emerge de una semilla, tratada con una composición  
 según la invención, y/o de una semilla sembrada en la vecindad inmediata (como se ha definido anteriormente) de la  
 semilla tratada, puede protegerse del daño producido por plagas y/o enfermedades de plantas. "Plagas y/o  
 50 enfermedades de plantas", como se usa en este documento, significa patógenos que producen daño a la planta y/o  
 que producen enfermedad de la planta mediante un objeto biológico (por ejemplo, espora, micelio, insecto) que es  
 capaz de infectar al huésped y que llega a la planta mediante la superficie de la tierra o el aire. Ejemplos de plagas  
 y/o enfermedad de plantas incluyen insectos, ácaros o caracoles, hongos, virus. "Protegido de plagas y/o  
 enfermedades de plantas", como se usa en este documento, significa que la planta de semillero que emerge de la  
 55 semilla tratada o de una semilla sembrada en la vecindad inmediata, como se ha definido anteriormente, de la  
 semilla tratada no son afectadas o a un grado mucho menor por plagas y/o enfermedades de plantas en  
 comparación con semillas o plantas de semillero que emergen de las mismas a las que no se aplicó la composición  
 según la invención.

Una semilla así tratada con una composición según la invención se beneficiará de la unión de alta afinidad a la  
 semilla de las proteínas de unión a semilla, preferentemente las proteínas de unión al antígeno, acopladas al (a los)  
 agente(s) de potenciamiento de planta, tanto si están comprendidas como si no en un vehículo, presentes en la  
 composición para el tratamiento de semillas, que puede producir periodos prolongados de protección de las plantas  
 60

- de semillero de plagas y/o enfermedad de plantas y/o cantidades reducidas de agente de potenciamiento de planta que necesita estar presente en la composición para el tratamiento de semillas con el fin de proporcionar protección adecuada de la planta de semillero que emerge de las semillas tratadas en comparación con semillas sin aplicación de la composición según la invención. Preferentemente, el agente de potenciamiento de planta se elige del grupo que comprende insecticidas, miticidas, acaricidas, molusquicidas, fungicidas, bactericidas o viricidas. Ejemplos de sustancias activas agroquímicas adecuadas para proteger del daño producido por plagas y/o enfermedad de plantas incluyen, pero no se limitan a, metalaxilo, fludioxinilo, carbendazim, ipconazol, carboxina, tiabendazol, fluquinconazol, carpropamid, fuberidazol, procloraz, oxadixilo, protioconazol y tifluzamida como fungicidas, imidacloprid, clotianidina, tiometoxam, tiodicarb y aldoxicarb como insecticidas. También preferentemente, la semilla se trata con una composición para el tratamiento de semillas que comprende uno o una combinación de agentes de potenciamiento de planta, que tienen actividad sistémica y que es/son absorbido/s por el sistema de raíces de la planta de semillero y se transportan hacia arriba a las partes aéreas de la planta de semillero en crecimiento, que puede disminuir la necesidad de aplicar composiciones agroquímicas de aplicación foliar a las plantas de semillero emergentes.
- En otra realización preferida más, una semilla así tratada con una composición según la invención y/o una planta de semillero que emerge de una semilla, tratada con una composición según la invención, y/o de una semilla sembrada en la vecindad inmediata (como se ha definido anteriormente) de la semilla tratada, puede protegerse del daño producido por malas hierbas y/u otras plantas no deseadas. "Protegida del daño producido por malas hierbas y/u otras plantas no deseadas", como se usa en este documento, significa que la semilla tratada y/o la planta de semillero que emerge de la semilla tratada y/o de una semilla sembrada en la vecindad inmediata, como se ha definido anteriormente, de la semilla tratada no son afectadas o a un grado mucho menor por el daño producido por las malas hierbas y/u otras plantas no deseadas en comparación con las semillas o plantas de semillero que emergen de las mismas a las que no se aplicó la composición según la invención. Tal protección puede ser directa, en casos en los que el agente de potenciamiento de planta comprendido en la composición para el tratamiento de semillas, sea herbicida, o puede ser indirecta, en casos en los que el agente de potenciamiento de planta comprendido en la composición para el tratamiento de semillas sea un protector, en cuyo caso la protección de la planta emergente necesita ser completada con una aplicación foliar de un herbicida. Un "protector", como se usa en este documento, es una sustancia activa agroquímica (como se define adicionalmente) que protege un cultivo del daño del herbicida.
- Una semilla así tratada con una composición según la invención se beneficiará de la unión de alta afinidad a la semilla de las proteínas de unión a semilla, preferentemente las proteínas de unión al antígeno, acopladas al (a los) agente(s) de potenciamiento de planta, tanto si están comprendidas como si no en un vehículo, presentes en la composición para el tratamiento de semillas, que puede producir periodos prolongados de protección de las plantas de semillero del daño producido por malas hierbas y/u otras plantas no deseadas y/o cantidades reducidas de agente de potenciamiento de planta que necesita estar presente en la composición para el tratamiento de semillas con el fin de proporcionar protección adecuada de la planta de semillero que emerge de las semillas tratadas en comparación con semillas no tratadas con una composición según la invención. Preferentemente, el agente de potenciamiento de planta se elige del grupo que comprende herbicidas y protectores. Ejemplos de sustancias activas agroquímicas adecuadas para proteger del daño producido por malas hierbas y/u otras plantas no deseadas incluyen, pero no se limitan a, triasulfurón y clomazona como herbicidas y cloquintocet-metilo, ciometrinilo, flurazol, fluxofenim, mefenpir-dietilo, anhídrido naftálico y oxabetrinilo como protectores.
- En otra realización preferida adicional, una planta de semillero que emerge de una semilla, tratada con una composición para el tratamiento de semillas según la invención, y/o de una semilla sembrada en la vecindad inmediata (como se ha definido anteriormente) de la semilla tratada, puede tener un rendimiento potenciado. "Rendimiento potenciado", como se usa en este documento, significa un aumento en el rendimiento de un producto recolectable de la planta por una cantidad medible con respecto al rendimiento del mismo producto recolectable de la planta producido bajo condiciones idénticas, pero sin la aplicación del método objeto. Preferentemente, el rendimiento aumenta el 1 % o más, más preferentemente, el rendimiento aumenta el 1,5 % o más, incluso más preferentemente, el rendimiento aumenta el 2 % o más, lo más preferentemente el rendimiento aumenta el 2,5 % o más. Los compuestos que potencian al rendimiento son conocidos para el experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, reguladores del crecimiento de plantas tales como auxinas, giberelinas, factores nod y microbios tales como *Bacillus subtilis*. Sin embargo, es evidente para el experto en la materia que, por ejemplo, fungicidas, insecticidas, nematocidas y herbicidas que previenen las pérdidas de rendimiento también tendrán un efecto de potenciamiento del rendimiento.
- Una semilla tratada con una composición según la invención se beneficiará de la unión de alta afinidad a la semilla del agente de potenciamiento de planta presente en la composición para el tratamiento de semillas, que puede producir rendimiento potenciado y/o cantidades reducidas de agente de potenciamiento de planta que necesita estar presente en la composición para el tratamiento de semillas con el fin de producir rendimiento potenciado medible en comparación con semillas sin aplicación de la composición según la invención. Preferentemente, el agente de potenciamiento de planta se elige del grupo que comprende fertilizantes, micronutrientes, reguladores del crecimiento de plantas, protectores del estrés, humectantes, inductores de plantas, agentes microbianos u hormonas de planta.

La semilla de planta, tratada con una composición según la invención, puede estar en forma de una semilla desinfectada, una semilla recubierta con película, una semilla incrustada, una minipíldora, una píldora estándar, una píldora fraccionada o en cualquier otra forma adecuada. Preferentemente, la semilla tratada según la invención puede almacenarse durante periodos de tiempo prolongados sin perder la potencia de germinación o rendimiento del cultivo. Preferentemente, la germinación de una semilla de planta, tratada con una composición según la invención, no se induce, ni retrasa, ni inhibe.

En una realización preferida, la semilla de planta es una semilla de un cultivo, como se ha definido anteriormente. Más preferentemente, la semilla de planta es una semilla de un cultivo, elegido del grupo que consiste en maíz, trigo, sorgo, centeno, soja, arroz, algodón, canola, girasol, remolacha azucarera, patatas, verduras, flores, pasto y pasto forrajero.

En otra realización preferida, la semilla de planta es una semilla de un cultivo mejorado. Un "cultivo mejorado", como se usa en este documento, significa un cultivo que es tanto genéticamente modificado como que es de otro modo seleccionado por selección natural, selección asistida por marcado o selección genómica, o métodos de cultivo convencional, que incluyen, pero no se limita a, técnicas de cultivo por mutación (molecular), para tener rasgos mejorados con respecto a los cultivos no mutantes. Ejemplos de cultivos mejorados incluyen, pero no se limitan a, cultivos tolerantes a glifosato, cultivos que expresan la toxina *Bacillus thuringiensis*, variedades resistentes a la enfermedad de cultivos, variedades de cultivo híbridas con rendimiento potenciado, etc.

Un cuarto aspecto de la invención es un método que comprende las etapas de (i) tratar una semilla con una composición según la invención, y (ii) sembrar la semilla tratada, en el que dicha composición:

(a) protege la semilla de planta contra patógenos transmitidos por semilla y/o transmitidos por la tierra; y/o

(b) protege la planta que crece de la semilla tratada y/o en la vecindad inmediata de la semilla tratada contra el daño producido por plagas y/o enfermedades y/o

(c) protege la semilla de planta y/o la planta que crece de la semilla tratada y/o en la vecindad inmediata de la semilla tratada contra el daño producido por malas hierbas y/u otras plantas no deseadas y/o

(d) potencia el rendimiento de la planta que crece de la semilla tratada y/o en la vecindad inmediata de la semilla tratada.

Tratar las semillas de planta con una composición para el tratamiento de semillas según la invención y entonces sembrarlas, por lo que la composición tanto protege mejor la semilla así tratada de los patógenos transmitidos por semilla y/o la tierra, y/o protege el cultivo emergente de plagas y/o enfermedades de plantas, y/o protege la semilla y/o la planta emergente del daño producido por malas hierbas y/u otras plantas no deseadas, y/o produce un rendimiento potenciado, pueden todos contribuir al desarrollo de cultivo más uniforme y recogida y, por lo tanto, a la calidad de cultivo mejorado en comparación con semillas no tratadas y sembradas según el método de la invención descrito anteriormente.

Un quinto aspecto de la invención es una proteína de unión a semilla, en el que dicha proteína de unión a semilla es una proteína de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones determinantes de la complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de la misma (que entonces normalmente contendrá al menos algunos de los restos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad).

Preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno es fácil de producir con alto rendimiento, preferentemente en un sistema de expresión recombinante microbiana, y conveniente de aislar y/o purificar posteriormente. También preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno es estable, tanto durante el almacenamiento como durante la utilización, lo que significa que la integridad de la proteína de unión al antígeno se mantiene bajo condiciones de almacenamiento y/o utilización, que pueden incluir temperaturas elevadas, ciclos de congelación-descongelación, cambios en el pH o en la fuerza iónica, irradiación UV, presencia de productos químicos nocivos y similares. Más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno es estable en una formulación agroquímica como se define más adelante. Lo más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno sigue siendo estable en una formulación agroquímica (como se define adicionalmente) cuando se almacena a temperatura ambiente durante un periodo de hasta dos años o cuando se almacena a 54 °C durante un periodo de al menos dos semanas.

La unión de la proteína de unión al antígeno a una molécula diana sobre una semilla de planta se produce preferentemente con alta afinidad: normalmente, la constante de disociación de la unión entre la proteína de unión al antígeno y la molécula diana sobre la semilla es inferior a  $10^{-5}$  M, más preferentemente la constante de disociación es inferior a  $10^{-6}$  M, incluso más preferentemente la constante de disociación es inferior a  $10^{-7}$  M, lo más preferentemente la constante de disociación es inferior a  $10^{-8}$  M. Preferentemente, la unión de la proteína de unión al antígeno a su molécula diana es específica, lo que significa que la proteína de unión al antígeno se une preferencialmente a un antígeno particular que está presente en una mezcla homogénea o heterogénea de diferentes antígenos. La especificidad de unión de una proteína de unión al antígeno puede analizarse por métodos tales como ELISA, como se describe en el Ejemplo 2, en el que la unión de la proteína de unión al antígeno a su

molécula diana se compara con la unión de la proteína de unión al antígeno a una molécula no relacionada y con la adhesión no específica de la proteína de unión al antígeno al recipiente de reacción. En ciertas realizaciones, una interacción de unión específica discriminará entre antígenos deseables y no deseables en una muestra, en algunas realizaciones más de aproximadamente 10 a 100 veces o más (por ejemplo, superior a aproximadamente 1000 o 10.000 veces). Preferentemente, la unión de la proteína de unión al antígeno a su molécula diana es todavía funcional bajo condiciones rigurosas, tales como temperatura baja o alta, pH bajo o alto, fuerza iónica baja o alta, irradiación UV, bajo contenido de humedad, bajo potencial del agua, presencia de productos químicos desnaturizantes o similares. En una realización preferida, dichas condiciones rigurosas se definen por un intervalo de pH de 4 a 9, más preferentemente por un intervalo de pH de 3 a 10, incluso más preferentemente por un intervalo de pH de 2 a 10, lo más preferentemente por un intervalo de pH de 1 a 11. En otra realización preferida, dichas condiciones rigurosas se definen por un intervalo de temperatura de 4-50 °C, más preferentemente un intervalo de temperatura de 0-55 °C, incluso más preferentemente un intervalo de temperatura de 0-60 °C. En otra realización preferida, dichas condiciones rigurosas se definen por un contenido de humedad inferior al 50 %, preferentemente un contenido de humedad inferior al 40 %, más preferentemente un contenido de humedad inferior al 30 %, incluso más preferentemente un contenido de humedad inferior al 25 %, lo más preferentemente un contenido de humedad inferior al 20 %. En otra realización preferida más, dichas condiciones rigurosas se definen por un potencial del agua inferior a -0,5 MPa, preferentemente un potencial del agua inferior a -0,75 MPa, más preferentemente un potencial del agua inferior a -1 MPa, incluso más preferentemente un potencial del agua inferior a -1,5 MPa, lo más preferentemente un potencial del agua inferior a -2 MPa. En otra realización preferida adicional, dichas condiciones rigurosas se definen como condiciones predominantes en métodos para el tratamiento de semillas como se ha descrito anteriormente.

Preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno se deriva de un anticuerpo de camélido. Más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno está comprendida en una secuencia de VHH. Lo más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno está comprendida en una secuencia de VHH, seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 – SEQ ID N° 11 (VHH 6B5, 6D7, 6D11, 6F2, 6H4, 7A5, 7A7, 7E9, 8A4, 8D6 y 12C3), o cualquier fragmento adecuado de la misma u homólogos de la misma. Preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno se une a un componente de la pared celular de planta. Más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno se une a un componente de la pared celular de planta elegido del grupo que consiste en hemicelulosa, polisacáridos pécticos, lignina, suberina o cutina. Incluso más preferentemente, la proteína de unión al antígeno según la invención se une a un polisacárido. Preferentemente, dichos polisacáridos no están contaminados con otros compuestos, y tienen una pureza de al menos el 85 % en peso/peso, preferentemente el 90 % en peso/peso, más preferentemente el 95 % en peso/peso, incluso más preferentemente el 98 % en peso/peso, lo más preferentemente el 99 % en peso/peso. Preferentemente, dicho polisacárido es un polisacárido estructural y/o un heteropolisacárido. Incluso más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno según la invención se une a pectina, preferentemente dicha pectina comprende un homogalacturonano de baja esterificación.

En una realización preferida, dicho polisacárido, preferentemente dicho heteropolisacárido o polisacárido estructural, más preferentemente, dicho polisacárido péptico, está en disolución, tal como pectina en zumo de fruta como ejemplo no limitante. En otra realización preferida, dicho polisacárido, preferentemente dicho heteropolisacárido o polisacárido estructural, más preferentemente dicho polisacárido péptico, está comprendido en una superficie sólida, tal como una superficie de la semilla como ejemplo no limitante. En otra realización preferida adicional, dicho polisacárido, preferentemente dicho heteropolisacárido o polisacárido estructural, más preferentemente dicho polisacárido péptico, está comprendido en material vegetal, tal como esquejes de planta usados para la propagación vegetativa de una planta, tubérculos o bulbos.

En otra realización adicional, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica cualquiera de las proteínas de unión al antígeno anteriores o fragmentos funcionales de las mismas también es parte de la presente invención. La invención también engloba el uso de cualquier proteína de unión al antígeno según la invención para aislar secuencias de aminoácidos que son responsables de la unión específica a una semilla de planta, preferentemente a un componente de la pared celular de planta, más preferentemente a un polisacárido (péptico), para construir dominios de unión artificiales basados en dichas secuencias de aminoácidos. De hecho, en las proteínas de unión al antígeno según la invención, las regiones estructurales y las regiones determinantes de la complementariedad son conocidas, y el estudio de derivados de las proteínas de unión al antígeno, que también se unen a una semilla de planta, que preferentemente se unen al mismo componente de la pared celular de planta, más preferentemente al mismo polisacárido (péptico), permitirán deducir los aminoácidos esenciales implicados en unir la semilla de planta, preferentemente a un componente de la pared celular de planta, más preferentemente un polisacárido (péptico). Este conocimiento puede usarse para construir una proteína de unión al antígeno mínima y para crear derivados de la misma.

Además, la presente invención también prevé vectores de expresión que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las proteínas de unión al antígeno anteriores o fragmentos funcionales de las mismas, además de células huésped que expresan tales vectores de expresión. Los sistemas de expresión adecuados incluyen sistemas de expresión constitutivos e inducibles en bacterias o levaduras, sistemas de expresión en virus tales como baculovirus, virus del bosque de Semliki y lentivirus, o transfección transitoria en células de insecto o de mamífero. Las células huésped adecuadas incluyen *E. coli*, *Lactococcus lactis*,

*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, y similares. Las células huésped de animal adecuadas incluyen HEK 293, COS, S2, CHO, NSO, DT40 y similares. La clonación, expresión y/o purificación de las proteínas de unión al antígeno pueden hacerse según técnicas conocidas por el experto en la materia.

5 Aunque genotecas intactas o sintéticas de VHH (para ejemplos de tales genotecas véanse los documentos WO9937681, WO0043507, WO0190190, WO03025020 y WO03035694) pueden contener ligantes adecuados para semillas de planta, una realización preferida de la presente invención incluye la inmunización de un individuo de una especie de *Camelidae* con uno o una combinación de varios componentes de la pared celular de planta, para exponer el sistema inmunitario del animal a los componentes de la pared celular de planta. Así, como se describe además en este documento, tales secuencias de VHH pueden generarse u obtenerse preferentemente inmunizando adecuadamente una especie de *Camelidae* con uno o una combinación de varios componentes de la pared celular de planta, obteniendo una muestra biológica adecuada de dicha especie de *Camelidae* (tal como una muestra de sangre, o cualquier muestra de linfocitos B), y generando secuencias de V<sub>H</sub>H dirigidas contra un componente de la pared celular de planta deseado, a partir de dicha muestra. Tales técnicas serán evidentes para el experto. Otra técnica más para obtener las secuencias de VHH deseadas implica inmunizar adecuadamente un mamífero transgénico que es capaz de expresar anticuerpos de cadena pesada (es decir, de manera que produzcan una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra un componente de la pared celular de planta), obteniendo una muestra biológica adecuada de dicho mamífero transgénico (tal como una muestra de sangre, o cualquier muestra de linfocitos B), y entonces generar secuencias de VHH dirigidas contra dicho componente de la pared celular de planta a partir de dicha muestra, usando cualquier técnica adecuada en sí conocida. Por ejemplo, para este fin, pueden usarse ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada y los métodos y técnicas adicionales descritos en el documento WO02085945 y en el documento WO04049794.

Por consiguiente, la invención engloba métodos de generación de proteínas de unión al antígeno según la invención. Como ejemplo no limitante, se proporciona un método de generación de proteínas de unión al antígeno que se unen específicamente a polisacáridos, preferentemente a polisacáridos pépticos que comprende

- (i) inmunizar un animal con una mezcla compleja de componentes de la pared celular de planta, y
- (ii) seleccionar proteínas de unión al antígeno que se unen a extractos de planta enriquecidos en polisacárido; y
- (iii) cribar para proteínas de unión al antígeno que se unen específicamente a polisacáridos (pépticos)

30 El cribado para proteínas de unión al antígeno, como ejemplo no limitante, que se unen específicamente a un componente de la pared celular de planta puede realizarse, por ejemplo, cribando un conjunto, colección o genoteca de células que expresan anticuerpos de cadena pesada sobre su superficie (por ejemplo, linfocitos B obtenidos de un camélido adecuadamente inmunizado), o bacteriófagos que muestran una fusión de genIII y VHH en su superficie, cribando una genoteca (intacta o inmunitaria) de secuencias de VHH, o cribando una genoteca (intacta o inmunitaria) de secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de VHH, que puede todo realizarse en un modo en sí conocido, y método que puede opcionalmente comprender además una o más de otras etapas adecuadas, tales como, por ejemplo y sin limitación, una etapa de maduración por afinidad, una etapa de expresar la secuencia de aminoácidos deseada, una etapa de cribar para unión y/o para actividad contra el componente de la pared celular de planta deseado, una etapa de determinar la secuencia de aminoácidos deseada o secuencia de nucleótidos, una etapa de introducir una o más sustituciones de ácido nucleico, una etapa de formatear en un formato multivalente y/o multiespecífico adecuado, una etapa de cribar para las propiedades biológicas y/o fisiológicas deseadas (es decir, usando un ensayo adecuado conocido en la técnica), y/o cualquier combinación de una o más de tales etapas, en cualquier orden adecuado.

Un sexto aspecto de la invención es el uso de una proteína de unión a semilla según la invención.

45 En una realización preferida, una proteína de unión a semilla, preferentemente una proteína de unión al antígeno según la invención, lo más preferentemente un VHH seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID 1-11 o cualquier fragmento adecuado del mismo, se usa para unir un agente de potenciamiento de planta a una semilla de planta. Como se ha explicado anteriormente, dicha proteína de unión a semilla, preferentemente dicha proteína de unión al antígeno, puede acoplarse a un agente de potenciamiento de planta, o a un vehículo que comprende un agente de potenciamiento de planta, por lo que dicha proteína de unión a semilla, preferentemente dicha proteína de unión al antígeno, es capaz de unir, preferentemente de retener, dicho agente de potenciamiento de planta en una forma específica a la semilla. Sin embargo, es evidente para el experto en la materia que las proteínas de unión a semilla de planta según la invención, especialmente las proteínas de unión al antígeno de polisacárido, que comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones determinantes de la complementariedad o cualquier fragmento adecuado de las mismas, puede aplicarse para otros usos.

En otra realización preferida, dicha proteína de unión a semilla, preferentemente dicha proteína de unión al antígeno, se usa para determinar la presencia y/o concentración de un polisacárido en una muestra. Los métodos de determinación de la presencia y/o concentración de un compuesto, por ejemplo un polisacárido, usando anticuerpos

son conocidos para el experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, inmunoprecipitación, inmunoensayo fluorescente, radioinmunoensayo (RIA), enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) e inmunoensayo magnético (MIA). La proteína de unión a semilla, preferentemente la proteína de unión al antígeno según la invención, puede marcarse para facilitar la detección y/o cuantificación del compuesto. El marcado de proteínas de unión al antígeno es conocido para el experto en la materia, e incluye marcado directo y marcado indirecto. En el marcado directo, la propia proteína de unión al antígeno se marca por una marca directamente detectable tal como, pero no se limita a, una marca de color, una marca fluorescente, una marca radiactiva o una partícula magnética. Las marcas fluorescentes son especialmente útiles, e incluyen, pero no se limitan a, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y otros derivados de fluoresceína, isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) y otros derivados de rodamina, proteína fluorescente de R-ficoeritrina (R-PE) y R-PE:cianina-5, y alofocianina. Alternativamente, el marcado puede llevarse a cabo de una forma indirecta. En este caso, la proteína de unión a semilla, preferentemente la proteína de unión al antígeno según la invención, puede unirse a un compuesto secundario detectable, o se fusiona o une a una marca, que por sí misma no es directamente detectable, pero puede detectarse uniendo a un compuesto secundario detectable. Es obvio para el experto en la materia que la detección puede ser el resultado de una cadena de acontecimientos, tales como, pero no se limitan a, unión en serie de compuestos, o activación de la marca después de la unión.

Como se usa en el presente documento, una "muestra" es una porción, trozo o segmento representativo de un todo que se quiere analizar para la presencia y/o concentración de uno o más polisacáridos. Dicha muestra puede ser una parte que se saca del todo, o puede ser el todo, medido en un punto representativo en el lugar y/o tiempo, como es el caso para una muestra medida en línea por un biosensor durante la fermentación. Como ejemplo no limitante, dicha muestra puede ser una muestra de comida, en la que la presencia o concentración del polisacárido necesita determinarse o cambiarse en relación con la capacidad alergénica de dicho polisacárido, o en relación con características físicas, químicas o microbiológicas deseadas o no deseadas del polisacárido, cambiando los parámetros de calidad del alimento, tales como una caducidad alterada. Como ejemplo no limitante, la desesterificación de pectina desempeña una función importante en el ablandamiento de fruta durante la maduración (Goulao, 2010), y la determinación de la estructura de pectina es esencial en el entendimiento de la función de la desesterificación en el evento de ablandamiento de fruta. El inmunoperfilado de polisacáridos pécticos, útiles, entre otros, durante la maduración de fruta, es conocido por el experto en la materia y se ha descrito por Willats y Knox (1999). Otro ejemplo es el uso de pectina para aumentar la capacidad de retención de agua del alimento o para la estabilización de zumos de frutas y bebidas de leche. Además, la pectina puede aumentar la caducidad de la carne procesada (Zheng et al., 1999), y frecuentemente se usa pectina como fibra dietética.

En otra realización preferida, dicha proteína de unión a semilla, preferentemente dicha proteína de unión al antígeno, se usa para aislar un polisacárido de una muestra. El aislamiento del polisacárido puede usarse para purificar el polisacárido de una mezcla, o puede estar previsto para eliminar un polisacárido contaminante o de otro modo no deseable de una muestra. Los métodos de uso de anticuerpos para aislar compuestos son conocidos por el experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, inmunoprecipitación y cromatografía de afinidad. Alternativamente, la proteína de unión a semilla, preferentemente la proteína de unión al antígeno según la invención, puede unirse a una membrana, con el fin de ser usada en filtración en membrana o técnicas similares. En una realización especial, la proteína de unión al antígeno puede fusionarse con una proteína de interés, que se quiere purificar, y la purificación se lleva a cabo poniendo en contacto la mezcla con una matriz que comprende polisacárido. Ejemplos no limitantes de dicho aislamiento y/o purificación pueden encontrarse en el tratamiento de aguas residuales. De hecho, el agua residual de algunas plantas de procesamiento de frutas, pero especialmente el agua residual de la industria del café, es rica en pectina, y alta en DBO y DQO. La purificación usando coagulación química, y degradación con radiación, se ha propuesto para reducir la DQO (Zayas et al.; 2007). Sin embargo, este método es bastante caro. La purificación usando un proceso de inmunoespecificidad (Harris, 1999) sería una solución respetuosa con el medioambiente, que permite la recuperación de pectina como corriente lateral valiosa. Las proteínas de unión a semilla, preferentemente las proteínas de unión al antígeno según la invención, son especialmente adecuadas para este fin, debido a su bajo coste de producción y su estabilidad en entornos adversos.

De un modo similar, podrían usarse proteínas de unión al antígeno de pectina según la invención en la producción de pectina. El método de producción clásico consiste en una extracción de la materia prima (tal como cáscaras de cítricos), una separación del material extraído y una precipitación en alcohol de la pectina del zumo. La precipitación es no selectiva, y da una mezcla de pectinas. El uso de proteínas de unión al antígeno según la invención permitiría purificar fracciones específicas a bajo coste.

Un séptimo aspecto de la invención es una composición agroquímica, que comprende al menos una proteína de unión a semilla, preferentemente una proteína de unión al antígeno según la invención.

Una "composición agroquímica", como se usa en este documento, significa una composición para uso agroquímico, como se define adicionalmente, que comprende al menos una sustancia activa agroquímica, como se define adicionalmente, opcionalmente con uno o más aditivos que favorecen la dispersión, atomización, deposición, humedecimiento de hojas, distribución, retención y/o captación óptima de agroquímicos. Como ejemplo no limitante, tales aditivos son diluyentes, disolventes, adyuvantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes de extensión, aceites, adhesivos, espesantes, penetrantes, agentes de tamponamiento, acidificantes, agentes antisedimentantes, agentes anticongelantes, fotoprotectores, agentes antiespumantes, biocidas y/o agentes del control de deriva.



“Uso agroquímico”, como se usa en este documento, no solo incluye el uso de composiciones agroquímicas como se ha definido anteriormente que son adecuadas y/o previstas para su uso en cultivos cultivados en el campo (por ejemplo, agricultura), sino que también incluye el uso de composiciones agroquímicas que están previstas para su uso en cultivos cultivados en invernadero (por ejemplo, horticultura/floricultura) o sistemas de cultivo hidropónico o usos en espacios verdes públicos o privados (por ejemplo, jardines privados, parques, campos deportivos), para proteger plantas o partes de plantas, que incluyen, pero no se limitan a, bulbos, tubérculos, frutas y semillas (por ejemplo de organismos perjudiciales, enfermedades o plagas), para controlar, preferentemente promover o aumentar, el crecimiento de plantas; y/o para promover el rendimiento de plantas, o las partes de plantas que son recogidas (por ejemplo sus frutas, flores, semillas etc.) e incluso el uso de composiciones agroquímicas que son adecuadas y/o están previstas para usos no de planta tales como usos domésticos (por ejemplo, herbicidas o insecticidas para uso doméstico o agentes para proteger telas o madera del daño producido por organismos perjudiciales), o usos industriales (por ejemplo, agentes para prevenir la incrustación o para proteger mercancías almacenadas del daño por organismos perjudiciales) o usos por los operarios del control de plagas (por ejemplo, para controlar insectos y roedores no deseables, etc.).

“Sustancia activa agroquímica”, como se usa en este documento, significa cualquier sustancia o principio activos que pueda usarse para uso agroquímico, como se ha definido anteriormente. Ejemplos de tales sustancias activas agroquímicas serán evidentes para el experto y pueden incluir, por ejemplo, compuestos que son activos como insecticidas (por ejemplo, insecticidas de contacto o insecticidas sistémicos, incluyendo insecticidas para uso doméstico), acaricidas, miticidas, herbicidas (por ejemplo, herbicidas de contacto o herbicidas sistémicos, incluyendo herbicidas para uso doméstico), fungicidas (por ejemplo, fungicidas de contacto o fungicidas sistémicos, incluyendo fungicidas para uso doméstico), nematocidas (por ejemplo, nematocidas de contacto o nematocidas sistémicos, incluyendo nematocidas para uso doméstico) y otros pesticidas (por ejemplo, avicidas, molusquicidas, piscicidas) o biocidas (por ejemplo, agentes para aniquilar bacterias, algas o caracoles); además de fertilizantes; reguladores del crecimiento tales como hormonas de planta; micronutrientes, protectores; feromonas; repelentes; cebos (por ejemplo, cebos para insectos o cebos para caracoles); y/o principios activos que se usan para modular (es decir, aumentar, disminuir, inhibir, potenciar y/o desencadenar) la expresión génica (y/u otros procesos biológicos o bioquímicos) en o por la planta objetivo (por ejemplo, la planta que va protegerse o la planta que va a controlarse). Las sustancias activas agroquímicas incluyen productos químicos, pero también ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN monocatenario o bicatenario, como, por ejemplo, se usa en el contexto de la tecnología de iARN), péptidos, polipéptidos, proteínas (incluyendo proteínas de unión a semilla o proteínas de unión al antígeno) y microorganismos. “Microorganismos”, como se usa en este documento, significa bacterias, hongos, levaduras, virus y similares. Ejemplos de tales sustancias activas agroquímicas serán evidentes para el experto; y, por ejemplo, incluyen, sin limitación: glifosato, paraquat, metolaclor, acetoclor, mesotriona, 2,4-D, atrazina, glufosinato, sulfosato, fenoxaprop, pendimetalina, picloram, trifluralina, bromoxinilo, clodinafop, fluroxipir, nicosulfurón, bensulfurón, imazetapir, dicamba, imidacloprid, tiametoxam, fipronilo, clorpirifos, deltametrina, lambda-cihalotrina, endosulfán, metamidofos, carbofurano, clotianidina, cipermetrina, abamectina, diflufenican, espinosad, indoxacarb, bifentrina, teflutrina, azoxistrobina, tiametoxam, tebuconazol, mancozeb, ciazofamid, fluazinam, piraclostrobina, epoxiconazol, clorotalonilo, fungicidas de cobre, trifloxistrobina, protioconazol, difenoconazol, carbendazim, propiconazol, tiofanato, azufre, boscalid y otros agroquímicos conocidos o cualquier combinación o combinaciones adecuadas de los mismos. Otros agroquímicos adecuados serán evidentes para el experto basándose en la divulgación en el presente documento, y pueden, por ejemplo, ser cualquier agroquímico comercialmente disponible, y por ejemplo incluyen cada uno de los compuestos enumerados en Phillips McDougall, AgriService November 2007 V4.0, Products Section – 2006 Market, Product Index págs. 10-20. Dichas sustancias activas agroquímicas pueden producirse en diferentes formas, que incluyen, pero no se limitan a, como cristales, como microcristales, como nanocristales, como cocrisales, como un polvo para extender, como gránulos, como un polvo, como pastillas, como un gel, como un concentrado soluble, como una emulsión, como un concentrado emulsionable, como una suspensión, como un concentrado en suspensión, como una suspoemulsión, como una dispersión, como un concentrado en dispersión, como una suspensión de microcápsulas o como cualquier otra forma o tipo de formulación agroquímica evidente para aquellos expertos en la materia. Las sustancias activas agroquímicas no solo incluyen sustancias o principios activos que están listos para uso, sino también precursores en una forma inactiva, que pueden ser activados por factores externos. Como ejemplo no limitante, el precursor puede activarse por cambios de pH, producidos por heridas de plantas tras el daño por insectos, por acción enzimática producida por ataque fúngico, o por cambios de temperatura o cambios en la humedad.

La composición agroquímica según la invención puede estar en una forma líquida, semisólida o sólida y, por ejemplo, mantenerse como un aerosol, polvo fluido, polvo humectable, gránulo humectable, concentrado emulsionable, concentrado en suspensión, microemulsión, suspensión de cápsulas, microcápsula seca, pastilla o gel, o suspenderse, dispersarse, emulsionarse o ponerse de otro modo en un medio líquido adecuado (tal como agua u otro medio acuoso, orgánico o aceitoso adecuado) para almacenamiento o aplicación. La composición agroquímica según la invención comprende al menos una, preferentemente más proteínas de unión al antígeno según la invención. La presencia de una o más proteínas de unión al antígeno según la invención en la composición agroquímica según la invención garantiza la unión de la sustancia activa agroquímica a su sitio de acción, tal como la planta o parte de planta (por ejemplo, el fruto, tubérculo o bulbo), la semilla de planta u otro material orgánico derivado de planta, mientras que se evita la adhesión de la sustancia activa agroquímica a recipientes de almacenamiento y/o equipo del operario. Opcionalmente, la composición comprende además uno o más

componentes adicionales tales como, pero no se limitan a, diluyentes, disolventes, adyuvantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes de extensión, aceites, adhesivos, espesantes, penetrantes, agentes de tamponamiento, acidificantes, agentes antisedimentantes, agentes anticongelantes, fotoprotectores, agentes antiespumantes, biocidas y/o agentes de control de deriva o similares, adecuados para su uso en la composición según la invención.

Un octavo aspecto de la invención es un kit de partes para la detección y/o determinación de la concentración de uno o más polisacáridos, que comprende al menos una proteína de unión al antígeno según la invención.

Posiblemente, el kit de partes también comprende reactivos necesarios para el marcado y/o detección y/o cuantificación de la proteína de unión al antígeno.

Un noveno aspecto de la invención es un biosensor para la detección y/o determinación de la concentración de uno o más polisacáridos, que comprende al menos una proteína de unión al antígeno según la invención.

Preferentemente, la proteína de unión al antígeno se inmoviliza sobre la capa detectora del biosensor; la detección de la unión puede ser, como ejemplo no limitante, óptica, electroquímica, por microbalanza de cristal de cuarzo, por magneto inmunosensores o por inmunosensores basados en voladizo micromecánicos. La tecnología para la inmovilización de la proteína de unión al antígeno y para la detección de la unión antígeno – proteína de unión al antígeno es conocida por el experto en la materia y se ha revisado, entre otros, por Marquette y Blum (2006), Fritz (2008) y Skottrup et al., (2008).

Un décimo aspecto de la invención es un agente de direccionamiento, capaz de unir un compuesto a una semilla de planta, en el que dicho agente de direccionamiento comprende al menos una proteína de unión a semilla según la invención.

Un “agente de direccionamiento”, como se usa en este documento, es una estructura molecular, preferentemente con un esqueleto de polipéptido, que comprende al menos una proteína de unión a semilla, preferentemente una proteína de unión al antígeno según la invención. Un agente de direccionamiento en su forma más simple consiste únicamente de una única proteína de unión a semilla; sin embargo, un agente de direccionamiento puede comprender más de una proteína de unión a semilla y puede ser monovalente o multivalente y monoespecífica o multiespecífica, como se define adicionalmente. Aparte de una única o múltiples proteínas de unión a semilla, un agente de direccionamiento puede comprender además otros restos, que pueden estar tanto químicamente acoplados como fusionados, tanto al extremo N como al extremo C, o incluso internamente fusionados, con la proteína de unión al antígeno. Dichos otros restos incluyen, sin limitación, uno o más aminoácidos, incluyendo aminoácidos marcados (por ejemplo, marcados fluorescentemente o radiactivamente) o aminoácidos detectables (por ejemplo, detectables por un anticuerpo), uno o más monosacáridos, uno o más oligosacáridos, uno o más polisacáridos, uno o más lípidos, uno o más ácidos grasos, una o más moléculas pequeñas, o cualquier combinación de lo anterior. En una realización preferida, dichos otros restos funcionan como espaciadores o conectores en dicho agente de direccionamiento.

Un “compuesto”, como se usa aquí, puede ser cualquier compuesto, preferentemente una sustancia activa, que incluye, pero no se limita a, proteínas y complejos de proteína tales como enzimas, o compuestos químicos, que incluyen, pero no se limitan a, sustancias activas agroquímicas, como se ha definido anteriormente. Preferentemente, dicho compuesto es un agente de potenciamiento de planta, como se ha definido anteriormente. Alternativamente, un compuesto puede estar comprendido en o sobre un vehículo, preferentemente un microvehículo, en el que dicho vehículo puede acoplarse, como se ha definido anteriormente, con uno o más agentes de direccionamiento que comprenden al menos una proteína de unión al antígeno según la invención. “Comprendido en un vehículo”, como se usa en este documento, significa unido sobre o contenido en por medios tales como, pero no se limitan a, incorporación, encapsulación y adsorción. Preferentemente, el vehículo es tal que el uno o más compuestos pueden estar incorporados, encapsulados o incluidos en el vehículo, por ejemplo como una nanocápsula, microcápsula, nanoesfera, microesfera, liposoma o vesícula. Preferentemente, los vehículos son tales que tienen características de liberación inmediata o gradual o lenta, por ejemplo durante varios minutos, varias horas, varios días o varias semanas. Por tanto, los vehículos pueden estar hechos de materiales (por ejemplo, polímeros) que se rompen o degradan lentamente (por ejemplo, debido a exposición prolongada a temperatura alta o baja, luz del sol, humedad alta o baja u otros factores o condiciones medioambientales) con el tiempo (por ejemplo, durante minutos, horas, días o semanas) y así liberan el compuesto del vehículo.

El agente de direccionamiento según la invención puede tanto ser un agente de direccionamiento “monoespecífico” como un agente de direccionamiento “multiespecífico”. Por un agente de direccionamiento “monoespecífico” se indica un agente de direccionamiento que comprende tanto una única proteína de unión al antígeno, como que comprende dos o más proteínas de unión al antígeno diferentes que están cada una dirigidas hacia el mismo sitio de unión. Así, un agente de direccionamiento monoespecífico es capaz de unirse a un único sitio de unión, tanto mediante una única proteína de unión al antígeno como mediante múltiples proteínas de unión al antígeno. Por un agente de direccionamiento “multiespecífico” se indica un agente de direccionamiento que comprende dos o más proteínas de unión al antígeno que están cada una dirigidas hacia diferentes sitios de unión. Así, un agente de direccionamiento “biespecífico” es capaz de unirse a dos sitios de unión diferentes; un agente de direccionamiento

“triespecífico” es capaz de unirse a tres sitios de unión diferentes; y etc., para agentes de direccionamiento “multiespecíficos”. Por tanto, con respecto a los agentes de direccionamiento descritos en el presente documento, el término “monovalente” se usa para indicar que el agente de direccionamiento comprende una única proteína de unión al antígeno; el término “bivalente” se usa para indicar que el agente de direccionamiento comprende un total de dos únicas proteínas de unión al antígeno; el término “trivalente” se usa para indicar que el agente de direccionamiento comprende un total de tres únicas proteínas de unión al antígeno; y etc., para agentes de direccionamientos “multivalentes”.

“Capaz de unir un compuesto a una semilla de planta”, como se usa en este documento, significa que la unión de la proteína de unión a semilla, preferentemente la proteína de unión al antígeno, comprendida en el agente de direccionamiento, a la semilla de planta, es suficientemente fuerte como para unir, más preferentemente para retener (como se ha definido anteriormente), dicho compuesto, preferentemente dicho agente de potenciamiento de planta, a una semilla de planta. Preferentemente, el compuesto está comprendido en o sobre un vehículo, más preferentemente un microvehículo. Preferentemente, dicho agente de direccionamiento se acopla por unión por afinidad o por unión covalente a dichos compuestos, incluso más preferentemente a dicho vehículo que contiene dichos compuestos, preferentemente dichos agentes de potenciamiento de planta.

Los métodos de acoplamiento del compuesto, preferentemente dicho agente de potenciamiento de planta, y/o vehículo al agente de direccionamiento, son conocidos por el experto en la materia, e incluyen, pero no se limitan a, unión covalente y unión por afinidad. Un ejemplo de unión covalente es una proteína de fusión, en la que el agente de direccionamiento y un compuesto de naturaleza proteínica se producen, preferentemente por medio de expresión recombinante de proteínas, como una unidad. Un enfoque alternativo a usar proteínas de fusión es usar reticulación química de restos en el agente de direccionamiento para la unión covalente al compuesto, que puede ser una segunda proteína u otro compuesto químico, usando química de acoplamiento convencional, por ejemplo como se describe por Fipula (2007) y en *Bioconjugate Techniques*, Hermanson, ed. Academic Press Inc., San Diego, CA, EE.UU., (2008). Restos de aminoácidos que incorporan grupos sulfhidrilo, tales como cisteína, pueden unirse covalentemente usando un reactivo biespecífico tal como maleimidofenilbutirato de succinimidilo (SMPB), por ejemplo. Alternativamente, grupos lisina localizados en la superficie de proteína pueden acoplarse a grupos carboxilo activados sobre la segunda proteína por acoplamiento de carbodiimida convencional usando 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). El acoplamiento entre el agente de direccionamiento y el compuesto o vehículo en el que el compuesto está comprendido puede ser directo, o puede usarse un espaciador o molécula bisagra. Ejemplos de tales espaciadores pueden encontrarse en los documentos WO0024884 y WO0140310.

Una realización preferida de la invención es el uso de un agente de direccionamiento, que comprende al menos una proteína de unión a semilla, preferentemente una proteína de unión al antígeno según la invención, lo más preferentemente un VHH seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID 1-11, o cualquier fragmento adecuado del mismo, para retener un agente de potenciamiento de planta a una semilla de planta. Preferentemente, el agente de direccionamiento se usa para retener un agente de potenciamiento de planta a una semilla de planta durante el tratamiento de semillas, almacenamiento de semillas, manipulación de semillas y/o plantación de semillas. Preferentemente, dicho agente de direccionamiento se acopla, por unión por afinidad o por unión covalente, a dicho agente de potenciamiento de planta. Incluso más preferentemente, dicho agente de direccionamiento se acopla, por unión por afinidad o por unión covalente, a un vehículo (como se ha descrito anteriormente) en el que está comprendido dicho agente de potenciamiento de planta. Esta realización es especialmente útil en caso de que un compuesto necesite encapsularse, incorporarse en o absorberse sobre una matriz para asegurar una liberación lenta del compuesto, o para aumentar la vida del compuesto, como es el caso para la encapsulación de bacterias vivas tales como *Rhizobacteria*.

Un undécimo aspecto de la invención es el uso de un agente de direccionamiento según la invención, para unir un agente de potenciamiento de planta a una planta o una parte de planta.

“Parte de planta”, como se usa en este documento, significa cualquier parte de planta tanto si es parte de una planta viva o en crecimiento intacta como si está aislada o separada de una planta viva intacta, e incluso puede concebirse material de planta muerta. Preferentemente, dicha parte de planta está seleccionada del grupo que consiste en semillas, raíces, frutas, conos, bulbos y tubérculos. Más preferentemente, dichas partes de planta están seleccionadas del grupo que consiste en semillas y frutas. Lo más preferentemente, dichas partes de planta están seleccionadas del grupo de semillas de maíz, trigo, sorgo, centeno, soja, arroz, algodón, canola, girasol, remolacha azucarera, patatas, verduras, flores, pasto y pasto forrajero, y frutas de manzana, pera, cítrico, banana o árboles de frutas de hueso.

Con el fin de ser capaces de unir, preferentemente de retener, un agente de potenciamiento de planta a una planta o una parte de planta, tanto un único como múltiples agentes de direccionamiento son tanto fusionados con como unidos al agente de potenciamiento de planta, tanto por un enlace covalente, por enlaces de hidrógeno, por interacciones dipolo-dipolo, por fuerzas de van der Waals débiles, o por cualquier combinación de las anteriores. “Unido”, como se usa en este documento, significa acoplado a, conectado a, anclado en, mezclado con o cubierta.

Una realización preferida de la invención es el uso de un agente de direccionamiento, que comprende al menos una proteína de unión a semilla, preferentemente una proteína de unión al antígeno según la invención, lo más preferentemente un VHH seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID 1-11, o cualquier fragmento adecuado del mismo, para retener un agente de potenciamiento de planta para unir un agente de potenciamiento de planta a una planta o una parte de planta.

Preferentemente, el agente de potenciamiento de planta está comprendido en o sobre un vehículo, preferentemente un microvehículo. Preferentemente, la proteína de unión a semilla comprendida en el agente de direccionamiento según la invención se une a un componente de la pared celular de planta comprendido en dicha planta o parte de planta. Preferentemente, el componente de la pared celular de planta es un polisacárido, más preferentemente el componente de la pared celular de planta es un polisacárido estructural o un heteropolisacárido, lo más preferentemente, dicho componente de la pared celular de planta es un polisacárido péptico.

En una realización preferida, dicho componente de la pared celular de planta está comprendido en tejido herido de una planta o una parte de planta, tal como, pero no se limita a, una herida producida por los métodos de recolección o por un insecto masticador o succionador. En tales casos, como ejemplo no limitante, los compuestos que aniquilan insectos pueden ser dirigidos a la herida para evitar daño adicional, o un compuesto fungicida o una combinación de compuestos fungicidas puede dirigirse a la herida de planta para evitar infección fúngica del tejido de planta herido. Más preferentemente, dicho tejido herido está comprendido en una fruta, un bulbo, un tubérculo o una semilla.

Un duodécimo aspecto de la invención es el uso de un agente de direccionamiento según la invención para modificar componentes de la pared celular de planta.

“Modificar componentes de la pared celular de planta”, como se usa en este documento, significa alterar el aspecto, que incluye, pero no se limita a, el color, el olor, el sabor o la sensación de componentes de la pared celular de planta (por ejemplo, uniendo pigmento, fragancia o suavizante a los componentes de la pared celular de planta), para aumentar o disminuir la concentración de uno o más componentes de la pared celular de planta en mezclas complejas de componentes de la pared celular de planta (por ejemplo, dirigiendo enzimas degradadoras a componentes de la pared celular de planta o secuestrando ciertos componentes de la pared celular de planta), o para crear componentes de la pared celular de planta completamente novedosos (‘componentes de la pared celular de planta de diseño’), que no existen de forma natural (por ejemplo, dirigiendo enzimas modificadoras de la pared celular de planta, tales como endo-ramnogalacturonano hidrolasa, endo-ramnogalacturonano liasa, endo-galactanasa, endo-arabinasa, arbinofuranosidasa, galactosidasa o exo-galacturosidasa). “Dirigir”, como se usa en este documento, significa que el compuesto se administra en o cerca de su sitio de acción.

El modificar componentes de la pared celular de planta puede demostrar ser útil para mejorar plantas y productos de planta, para mejorar las características de procesamiento y para generar nuevos materiales como ingredientes para alimentos o materiales médicos. Un agente de direccionamiento según la invención puede ser útil para modificar componentes de la pared celular de planta, tanto cuando se aplica directamente a mezclas de componentes de la pared celular de planta como incluso *in vivo* en plantas transgénicas usando métodos como se describen en el documento WO01/59137.

En una realización preferida, el agente de direccionamiento según la invención es una proteína de fusión. Las proteínas de fusión son conocidas por el experto en la materia y consisten en dos o más proteínas, partes de proteína o péptidos que se unen juntos, tanto por medios químicos (tales como por reticulación o por unión covalente) como por métodos de ADN recombinante. Las proteínas de fusión son particularmente útiles ya que añaden ciertas características funcionales al componente de fusión, por ejemplo, aumentan la solubilidad o modifican la especificidad del sustrato. Una proteína de fusión según la invención comprende al menos una proteína de unión al antígeno según la invención, en la que la proteína de unión al antígeno proporciona ciertas características, por ejemplo, su afinidad por componentes de la pared celular de planta, a su componente de fusión. En una realización preferida, la proteína de unión al antígeno comprendida en la proteína de fusión permite el direccionamiento de la proteína de fusión a un componente de la pared celular de planta, tal como el direccionamiento de una enzima de degradación de lignina a lignina en una mezcla de sustrato para la producción de bioetanol. En otra realización preferida, la proteína de unión al antígeno comprendida en la proteína de fusión permite la inmovilización de la proteína de fusión sobre cualquier tipo de matriz sólida, que es particularmente útil para la purificación de la proteína de fusión, por ejemplo una proteína de unión al antígeno que se une a Sepharose para la purificación sobre matrices de Sepharose.

Un último aspecto de la invención es una composición agroquímica, que comprende al menos un agente de direccionamiento según la invención.

Preferentemente, dicha composición agroquímica (como se ha definido anteriormente) es una composición para el tratamiento de semillas. Preferentemente, dicho agente de direccionamiento comprende más de una proteína de unión a semilla. La combinación de más de una proteína de unión a semilla en un agente de direccionamiento puede tener como beneficio adicional tanto que la unión a semilla sea más fuerte como que sea más específica.

**Breve descripción de las figuras****Figura 1**

5 Unión de VHH a semillas nativas de *Arabidopsis* de las que se han obtenido imágenes por microscopía confocal con obtención de imágenes espectral y desmezcla lineal. Se registraron la autofluorescencia de semillas y espectros de Alexa488 y se asignaron a diferentes pseudocolores. Se incubaron semillas con VHH 6D7 y se detectaron VHH unidos con anticuerpos anti-histidina/conjugados con Alexa488. Se muestra solo la señal de unión específica de VHH a semilla.

**Figura 2**

10 Unión de VHH a sitios dañados de piel de manzana. Se prepararon discos de piel de manzana usando una perforadora y se incubaron con diversos VHH. Se detectaron VHH unidos por incubación con anticuerpos anti-histidina de ratón monoclonales directamente conjugados con el colorante fluorescente Alexa-488.

**Figura 3**

15 Unión de VHH 6D7 (A), 7A5 (B), 7A7 (C), 7E9 (D) a perforaciones de hoja de patata y unión de VHH 6D7 (E) a tira de hoja de trigo. Se hicieron perforaciones de hojas usando una perforadora y se incubaron con VHH. Las tiras se cortaron de una hoja de trigo y se incubaron con VHH. Se detectaron VHH unidos por incubación con anticuerpos anti-histidina/conjugados con Alexa488. Se observó que VHH se unían fuertemente a perforaciones de hoja o trozos de hoja, predominantemente en sitios de tejido herido.

**Figura 4**

20 Perfiles de unión de VHH sobre matrices que contienen 36 oligosacáridos conjugados con albúmina de suero bovino (BSA) (columnas A-D en cada matriz) y 45 polisacáridos (columnas E-I en cada matriz) aplicados sobre nitrocelulosa. Cada muestra se representa por cuatro manchas sobre la matriz (dos concentraciones por duplicado). Las matrices se sondaron con 5 µg/ml de VHH seleccionados y se detectaron VHH unidos con anticuerpos anti-histidina secundarios y conjugados con enzima terciarios. Se observaron fuertes señales de unión, predominantemente en pectinas con bajos grados de esterificación, que indican la unión a epítopes de homogalacturonano.

E1 Pectina de lima, DE 11 %

F1 Pectina de lima, DE 43 %

G1 Pectina de lima, DE 0 %

H1 Pectina de lima, DE 16 %

I2 Pectina enriquecida en RGII (vino tinto)

I3 Mucilago de semilla (*Arabidopsis*)

H4 RGI #5 (patata)

**Figura 5:**

Unión de microcápsulas a semillas de cultivo. Se incubaron semillas de arroz (A), trigo (B) y maíz (C) con VHH de unión a semilla acoplado a microcápsulas fluorescentes. Se muestran microcápsulas sin VHH para cada semilla de cultivo como condición de control.

**Figura 6:**

35 Unión de microcápsulas a sitios dañados de piel de manzana y superficie de hoja de planta de patata dañada. Se incubaron discos de piel de manzana y hoja de patata con semilla y VHH de unión a tejido herido acoplado a microcápsulas fluorescentes. Las microcápsulas se unieron predominantemente a sitios de daño sobre fruta o tejido herido sobre plantas.

35

**EJEMPLOS****Ejemplo 1: Generación y selección de VHH*****Inmunización de llamas con homogeneizado de hoja de patata, u homogeneizado de hoja de trigo***

Con el objetivo de la generación de una respuesta inmunitaria contra materiales de planta expuestos a la superficie, se inmunizaron llamas con homogeneizado de hoja de patata u homogeneizado de hoja de trigo del siguiente modo: se prepararon hojas homogeneizadas de plantas de patata (*Solanum tuberosum* variedad Désirée) o plantas de trigo (*Triticum aestivum* variedad Boldus) congelando hojas en nitrógeno líquido y homogeneizando dichas hojas con mortero y pistilo hasta que se obtuvo un polvo fino. Se usó el ensayo de proteínas de Bradford para determinar la concentración de proteína total. Se prepararon alícuotas, se guardaron a -80 °C, y las suspensiones se usaron para inmunización.

Se inmunizaron llamas a intervalos semanales con 6 inyecciones intramusculares de hojas de patata homogeneizadas, u hojas de trigo homogeneizadas, según procedimientos convencionales. Se inmunizaron 3 llamas, "407928", "Chilean Autumn" y "Niagara", con hojas de patata homogeneizadas y otras 2 llamas, "33733" y "Organza", se inmunizaron con hojas de trigo homogeneizadas. Las llamas "407928" y "33733" se inmunizaron usando adyuvante LQ (Gerbu), y las llamas "Chilean Autumn", "Niagara" y "Organza" se inmunizaron usando adyuvante incompleto de Freund (FIA). Las dosis para las inmunizaciones de las llamas "407928" y "33733" fueron 1 mg de proteína total para cada día 0, 7, 14, 21, 28, 36, y se recogieron PBL en el día 40. En el momento de recogida de PBL en el día 40, se recogieron sueros de las llamas "407928" y "33733". Las dosis para inmunizaciones de las llamas "Chilean Autumn", "Niagara" y "Organza" fueron 100 µg de proteína total para el día 0, y 50 µg para los días 7, 14, 21, 28 y 35. En el día 0, día 25, y en el momento de recogida de PBL en el día 38, se recogieron sueros de las llamas "Chilean Autumn", "Niagara" y "Organza".

**Construcción de genotecas** – A partir de cada llama inmunizada se preparó una genoteca de VHH separada. Se aisló ARN de linfocitos de sangre periférica, seguido de síntesis de ADNc usando cebadores hexámeros aleatorios y Superscript III según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Se realizó una primera PCR para amplificar VHH y VH usando una mezcla de cebador directo [relación de 1:1 de call001 (5'-gtcctggctgctcttctacaagg-3') y call001b (5'-cctggctgctcttctacaagg-3')] y cebador inverso call002 (5'-ggtacgtgctgtgaactgttcc-3'). Después del aislamiento de los fragmentos de VHH se realizó una segunda PCR usando cebador directo A6E (5'-gatgtgcagctgcaggagctcggagg-3') y cebador inverso 38 (5'-ggactagtcggccgctggagacggtgacctgggt-3'). Los fragmentos de PCR se digirieron usando enzimas de restricción *Pst*I y *Eco*91I (Fermentas), y se ligaron en la dirección 5' del gen pIII en el vector pMES4 (GenBank: GQ907248.1). Los productos de ligación fueron precipitados con etanol según protocolos convencionales, se resuspendieron en agua y se sometieron a electroporación en células TG1. Los tamaños de genotecas oscilaron de 1E+08 a 6E+08 clones independientes. Se realizó PCR de colonias individuales en clones elegidos aleatoriamente de las genotecas para evaluar los porcentajes de inserción de las genotecas. Todas las genotecas tuvieron ≥ 90 % de porcentajes de inserción, excepto por la genoteca de la llama inmunizada "Organza" que tuvo un porcentaje de inserción del 80 %. Las genotecas se numeraron 27, 28, 29, 31, 32 para las llamas "407928", "33733", "Chilean Autumn", "Niagara" y "Organza", respectivamente. Se produjo el fago de cada una de las genotecas usando el fago colaborador VCSM13 según procedimientos convencionales.

***Selecciones de fagos contra extractos enriquecidos en componentes de la pared celular de planta, u hojas enteras***

Se prepararon extractos de hoja de patata enriquecidos en componentes de la pared celular de planta a partir de cutícula y epidermis adherente, eliminados en tiras delgadas de tallos de plantas de patata. Se prepararon extractos de hoja de trigo enriquecidos en componentes de la pared celular de planta a partir de cutícula y epidermis adherente, eliminados en tiras delgadas de hojas de vainas de trigo. Se extrajeron extractos enriquecidos en polisacáridos pécticos usando CDTA (Moller et al., 2007). Las tiras se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron con mortero y pistilo hasta que se obtuvieron polvos finos. Se prepararon extractos enriquecidos en polisacáridos pécticos resuspendiendo los polvos finos en CDTA 50 mM a pH 6,5 usando 10 ml por gramo de material molido y rotación cabeza sobre cabeza a 4 °C durante 30 minutos. Se separaron el extracto y el material insoluble usando una jeringa adaptada con un filtro. Los extractos se limpiaron adicionalmente por centrifugación en una microcentrífuga a 20.000 g durante 5 minutos.

Se realizaron selecciones de primera ronda contra extracto de CDTA epidérmico de patata en pocillos de una placa de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) recubiertos con extracto de CDTA epidérmico de patata diluido 10 veces o 1000 veces en tampón carbonato 0,1 M a pH 8,3 para tanto la primera como la segunda rondas de selección. Se realizaron recubrimientos a 4 °C durante la noche. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS/0,05 % de Tween-20 y se bloquearon con 5 % de leche desnatada en PBS (5 % de MPBS). Se suspendieron los fagos en 2,5 % de MPBS y se usaron aproximadamente 2E+11 UFC para cada pocillo. Después de unirse a los pocillos a temperatura ambiente durante 2 h, los fagos no unidos se eliminaron por un amplio lavado con PBS/0,05 % de Tween-20 y PBS. Los fagos unidos se eluyeron a temperatura ambiente con 0,1 mg/ml de tripsina (Sigma) en PBS durante 30 min. Los fagos eluidos se transfirieron a una placa de polipropileno de 96 pocillos (Nunc) que contenía exceso de inhibidor de tripsina AEBSF (Sigma). Se compararon los títulos de fago de los pocillos recubiertos con diana con títulos de fago de pocillos de blanco para evaluar los enriquecimientos. Los fagos se amplificaron usando células TG1 frescas

según procedimientos convencionales. Los enriquecimientos en la ronda de selección 1 fueron  $1E+03$ , 20, 20, 15 y 5 veces para las genotecas 27, 28, 29, 31, 32, respectivamente y  $>100$  veces para todas las genotecas en la ronda de selección 2. Se realizaron selecciones contra extracto de CDTA epidérmico de trigo similarmente a las selecciones contra extracto de CDTA epidérmico de patata, pero los pocillos se recubrieron con extracto de CDTA epidérmico de trigo diluido 20 veces y 2000 veces para tanto la primera como la segunda rondas de selección. Los enriquecimientos en la ronda de selección 1 fueron  $>100$ ,  $>10$ , 1, 10 y 5 veces para las genotecas 27, 28, 29, 31, 32, respectivamente. Los enriquecimientos en la ronda de selección 2 fueron  $>10$  veces para la genoteca 29 y  $>100$  veces para las genotecas 27, 28, 31 y 32. Se realizaron selecciones contra hojas de patata en dos rondas de selección consecutivas usando partículas de hoja en la ronda 1 y hojas enteras en la ronda 2. Se usaron las genotecas 27, 28, 29, 30, 31 y 32 para las selecciones contra hojas. Las partículas de hoja para las selecciones de primera ronda se prepararon mezclando hojas de patata en PBS usando un homogeneizador Ultra-Turrax T25. Las partículas de hoja se recogieron de la suspensión por centrifugación. El sobrenadante, llamado aquí "fracción soluble de hoja homogeneizada", está supuestamente enriquecido en componentes intracelulares y se usó en disolución durante la selección de fagos para competir ligantes con epítopes intracelulares. Los fagos de genoteca se preincubaron con la fracción soluble de hoja homogeneizada en 2 % de MPBS usando rotación cabeza sobre cabeza a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las mezclas se añadieron a partículas de hoja y se incubaron con rotación cabeza sobre cabeza a temperatura ambiente durante 2 horas. Se recogieron las partículas de hoja con fagos unidos por centrifugación y se desecharon los sobrenadantes. Se lavaron exhaustivamente las partículas de hoja con fagos unidos por lavados consecutivos con PBS. Los lavados se realizaron resuspendiendo las partículas de hojas en PBS, centrifugando las partículas de hojas y desechando los sobrenadantes. La elución de fagos y la infección de TG1 se realizaron como antes. Para la segunda ronda de selección se usaron hojas intactas enteras. Las hojas se incubaron flotando invertidas sobre disoluciones de fago en 2 % de MPBS y se dejó que los fagos se unieran a temperatura ambiente durante 2 horas. Las hojas se lavaron exhaustivamente transfiriendo las hojas a tubos nuevos con PBS. La elución de fago unido se realizó con TEA 100 mM en agua, y las disoluciones con fago eluido se neutralizaron usando la mitad del volumen de fago eluido de Tris 1 M a pH 7,5. La infección de TG1 se realizó como antes.

**Selección de colonias individuales de salidas de selección** – Se seleccionaron clones individuales de las selecciones de la primera y segunda ronda contra extracto de CDTA epidérmico de patata: se seleccionaron un total de 321 clones después de tanto las selecciones de la primera como de la segunda ronda de todas las genotecas. De las selecciones contra extracto de CDTA epidérmico de trigo se seleccionaron un total de 162 clones después de las selecciones de la segunda ronda de todas las genotecas. De las selecciones de hoja de patata se seleccionó un total de 184 clones después de las selecciones de la segunda ronda de las genotecas 27, 28, 29, 31 y 32. Se infectaron células TG1 frescas con fago eluido diluido en serie y se sembró en agar LB; 2 % de glucosa; 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Se seleccionaron colonias individuales en placas de 96 pocillos que contenían 100  $\mu$ l por pocillo de 2xTY; 10 % de glicerol; 2 % de glucosa; 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las placas se incubaron a 37 °C y se guardaron a -80 °C como placas de reserva.

### **Ejemplo 2: Caracterización de VHH**

**ELISA de unión de un solo punto** – Se usó un ELISA de unión de un solo punto para identificar clones que se unen a extractos de planta. Se prepararon extractos que contenían VHH para ELISA del siguiente modo. Se inocularon placas de 96 pocillos con 100  $\mu$ l por pocillo de 2xTY, 2 % de glucosa 100 de  $\mu$ g/ml de ampicilina de las placas de reserva y se cultivaron a 37 °C durante la noche. Se usaron 25  $\mu$ l por pocillo de cultivo durante la noche para inocular placas de pocillos profundos de 96 pocillos nuevas que contenían 1 ml por pocillo de 2xTY; 0,1 % de glucosa; 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Después de cultivar a 37 °C en un incubador con agitación durante 3 horas, se añadió IPTG a una concentración final 1 mM y se produjo VHH recombinante durante una incubación adicional durante 4 horas. Las células se centrifugaron por centrifugación a 3.000 g durante 20 minutos y se guardaron a -20 °C durante la noche. Se descongelaron sedimentos de células, se agitaron brevemente con vórtex y se añadieron 125  $\mu$ l por pocillo de PBS a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en una plataforma agitadora de ELISA a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las placas se centrifugaron a 3.000 g durante 20 minutos y se transfirieron 100  $\mu$ l por pocillo de extracto que contenía VHH a placas de polipropileno de 96 pocillos (Nunc) y se guardaron a -20 °C hasta uso adicional.

Se analizó la unión de clones de selecciones de extracto de CDTA epidérmico de patata en tanto extracto de CDTA epidérmico de patata como extracto de CDTA epidérmico de trigo usando placas de ELISA recubiertas con 100  $\mu$ l por pocillo de extractos de CDTA epidérmicos de patata diluidos 30 veces y de trigo 30 veces en carbonato 0,1 M a pH 8,3. Se analizó la unión de los clones de las selecciones de extracto de CDTA epidérmico de trigo usando placas de ELISA recubiertas con 100  $\mu$ l por pocillo de extracto de CDTA epidérmico de trigo diluido 20 veces en carbonato 0,1 M a pH 8,3. Después del recubrimiento a 4 °C durante la noche y continuar el recubrimiento a temperatura ambiente durante 1 hora al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS / 0,05 % de Tween-20 y se bloquearon con 5 % de leche desnatada en PBS durante 1,5 horas. Se vaciaron las placas y se llenaron con 90  $\mu$ l por pocillo 1 % de MPBS. Se añadieron 10  $\mu$ l de extracto que contenía VHH de cada clon a pocillo(s) recubierto(s) de antígeno y un pocillo de blanco. Se dejó que VHH se uniera a temperatura ambiente durante 1 hora y se eliminó VHH no unido lavando tres veces con PBS / 0,05 % de Tween-20. Se detectó VHH no unido con incubaciones secuenciales con anticuerpos anti-histidina de ratón monoclonales (Abd Serotec) en 1 % de MPBS / 0,05 % de

Tween-20 y anticuerpos de molécula completa anti-IgG de ratón de conejo conjugados con fosfatasa alcalina (RaM/AP) (Sigma) en 1 % de MPBS / 0,05 % de Tween-20. Se eliminaron anticuerpos no unidos lavando tres veces con PBS / 0,05 % de Tween-20 después de cada incubación de anticuerpo. Las placas se lavaron dos veces más con PBS y se añadieron 100 µl de sustrato de hexahidrato de disodio de pNPP (Sigma) a cada pocillo.

- 5 Se midió la absorbancia a 405 nm y se calculó la relación de VHH unido a pocillo(s) recubierto(s) de diana y un pocillo no recubierto de diana para cada clon. El 23 % de los clones tuvo una relación mayor de 2 y estos clones se seleccionaron en primer lugar para caracterización más detallada. Posteriormente se revisó un segundo grupo de clones con una relación entre 1,15 y 2, y que comprendía 10 % de todos los clones. No se analizaron adicionalmente clones con una relación inferior a 1,15.
- 10 Para clones de selecciones de hoja entera se desarrolló un ELISA adaptado. Se usaron discos de hojas flotando invertidas en lugar de pocillos de recubrimiento con antígeno. Las incubaciones fueron similares a los ELISA de extractos. Después de la incubación con el sustrato, se eliminaron los discos de hojas de los pocillos usando unas pinzas y se midió la absorbancia a 405 nm. Se compararon las señales obtenidas de cada clon con señales obtenidas de pocillos con discos de hojas sin incubación de anticuerpo primario y se calcularon las relaciones. Un anticuerpo de unión a superficie de la hoja que se encontró y caracterizó de selecciones de extracto epidérmico se usó como anticuerpo de control positivo. Se analizaron adicionalmente VHH con una relación mayor de 1,5 por secuenciación.

**PCR y secuenciación de colonias individuales** – Se realizó PCR y secuenciación de colonias individuales en clones positivos para ELISA del siguiente modo. Se diluyeron cultivos de pocillos de placa de reserva con clones positivos para ELISA 10 veces en agua estéril. Se usaron 5 µl de estos clones diluidos como molde para PCR usando el cebador directo MP57 (5'-ttatgcttccggctcgtatg-3') y el cebador inverso GIII (5'-ccacagacagccctcatag-3'). Los productos de PCR se secuenciaron por secuenciación de Sanger usando el cebador MP57 (VIB Genetic Service Facility, Universidad de Amberes, Bélgica). De las selecciones contra los extractos enriquecidos en componentes de la pared celular de planta se encontraron VHH 6D7, VHH 7A5, VHH 6B5, VHH 6D11, VHH 6F2, VHH 6H4, VHH 7A7, VHH 7E9, VHH 8A4 y VHH 8D6. Los clones VHH 6B5, VHH 6D11, VHH 6F2, VHH 6H4 son variantes de un solo aminoácido de VHH 7A5. VHH 7E9 es una variante de un solo aminoácido de VHH 7A7. VHH 8A4 y VHH 8D6 son variantes de un solo aminoácido el uno del otro. De las selecciones contra partículas de hoja y hojas enteras se encontró VHH 12C3.

**Producción y purificación de anticuerpos** – Se produjeron VHH en la cepa supresora de *E. coli* TG1 o cepa no supresora WK6 (Fritz et al., Nucleic Acids Research, Volumen 16 Número 14 1988) según procedimientos convencionales. Brevemente, se hicieron extensiones de colonias y se inocularon cultivos durante la noche de colonias individuales en 2xTY; 2 % de glucosa; 100 µg/ml de ampicilina. Los cultivos durante la noche se usaron para inocular cultivos frescos 1:100 en 2xTY; 0,1 % de glucosa; 100 µg/ml de ampicilina. Después de cultivar a 37 °C en un incubador con agitación durante 3 horas, se añadió IPTG a una concentración final 1 mM y se produjeron VHH recombinantes durante una incubación adicional durante 4 horas. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1/50 del volumen de cultivo original de tampón de extracción periplásmico (fosfato 50 mM a pH 7; NaCl 1 M; EDTA 1 mM) y se incubaron con rotación cabeza sobre cabeza a 4 °C durante la noche. Se centrifugaron esferoplastos por centrifugación a 3.000 g y 4 °C durante 20 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y se centrifugaron otra vez a 3.000 g y 4 °C durante 20 minutos. Se purificaron VHH marcados con hexahistidina del extracto periplásmico usando 1/15 del volumen de extracto de resina de afinidad por metal TALON (Clontech), según las instrucciones del fabricante. Se concentraron VHH purificados y se dializaron contra PBS usando dispositivos de corte de peso molecular 5 kDa de Vivaspin (MWCO) (Sartorius Stedim), según las instrucciones del fabricante.

### **Ejemplo 3: Unión de VHH a semillas de planta**

45 **Unión de VHH a semillas de cultivo no tratadas** – Se investigó la unión de fragmentos de anticuerpos de VHH a una amplia variedad de semillas de cultivo usando semillas de maíz, tomate, arroz y trigo. Se incubaron semillas de tomate, arroz y trigo por cuadruplicado con disoluciones que contenían 2,5 - 5 µg/ml de VHH marcado con hexahistidina en 1 % de BSA en PBS y se incubaron en una placa de filtración de pocillos profundos de 0,45 µm de 96 pocillos (Millipore) durante 1 hora con balanceo suave en una plataforma de agitación de ELISA. Las condiciones de control incluyeron incubaciones con VHH de unión no a semilla no relacionado e incubaciones sin VHH. Se eliminaron las disoluciones que contenían VHH no unido usando un conjunto de placa de filtración (Millipore). Se detectaron VHH unidos con incubaciones secuenciales con anticuerpos anti-histidina de ratón monoclonales (Abd Serotec) en 1 % de BSA en PBS y anticuerpos de molécula completa anti-IgG de ratón de conejo conjugados con fosfatasa alcalina (RaM/AP) (Sigma) en 1 % de BSA en PBS. Se realizaron cinco lavados secuenciales entre cada incubación de anticuerpo. Los lavados se realizaron por incubación con PBS y balanceo suave en una plataforma de agitación de ELISA. Se eliminaron las disoluciones de lavado usando el conjunto de placa de filtración. Se añadió sustrato de hexahidrato de disodio de pNPP (Sigma) a cada pocillo y se dejó que reaccionara hasta que el color del sustrato fue claramente visible (5 - 25 minutos). Los sustratos se recogieron usando el conjunto de placa de filtración y se midió la absorbancia a 405 nm y se comparó la señal de VHH de unión a semilla con la coloración del sustrato con semillas de blanco y semillas tratadas con VHH de control no relacionado. Se observó unión de VHH clara y



reproducibile a semillas de cultivo tales como arroz, trigo y tomate, es decir, para VHH 7A7 y 12C3 (véase la Tabla 1).

Se realizó un ensayo similar para investigar la unión de fragmentos de anticuerpos de VHH a semillas de maíz. Se incubaron semillas de maíz por cuadruplicado con disoluciones que contenían 2,5 - 5 µg/ml de VHH marcado con hexahistidina en 1 % de BSA en PBS y se incubaron en tubos o pocillos de reacción de 2 ml de una placa de 12 pocillos durante 1 hora con balanceo suave en una plataforma de agitación de ELISA. Las condiciones de control incluyeron incubaciones con VHH de unión no de semilla no relacionado e incubaciones sin VHH. Se eliminaron las disoluciones que contenían VHH no unido usando un sistema de aspiración a vacío. Se detectaron VHH unidos con incubaciones secuenciales con anticuerpos anti-histidina de ratón monoclonales (Abd Serotec) en 1 % de BSA en PBS y anticuerpos de molécula completa anti-IgG de ratón de conejo conjugados con fosfatasa alcalina (RaM/AP) (Sigma) en 1 % de BSA en PBS. Se realizaron cinco lavados secuenciales entre cada incubación de anticuerpo. Se realizaron lavados por incubación con PBS y balanceo suave en una plataforma de agitación de ELISA. Se eliminaron las disoluciones de lavado usando aspiración a vacío. Se añadió sustrato de hexahidrato de disodio de pNPP (Sigma) a cada tubo o pocillo y se dejó que reaccionara hasta que la coloración del sustrato fue claramente visible (5 - 25 minutos). Se recogieron los sustratos y se midió la absorbancia a 405 nm y se comparó la señal de VHH de unión a semilla con la coloración del sustrato con semillas de blanco y semillas tratadas con VHH de control no relacionado. Se observó unión de VHH clara y reproducibile a semillas de cultivo tales como maíz, es decir, para VHH 7A7 (véase tabla 1). Fue sorprendente que, aunque no se habían hecho selecciones ni cribados contra semillas de planta, se encontró que VHH mostró unión clara y específica a semillas de planta particulares.

Tabla 1: Unión de VHH a semillas de cultivo por cuadruplicado. Se muestran valores promedio para la unión y desviación estándar. Las condiciones de control son VHH no relacionado e incubaciones sin VHH. Se encontraron VHH de unión a semilla de cultivo con diferente especificidad.

	Trigo	Trigo	Tomate	Tomate	Arroz	Arroz	Maíz	Maíz
	Promedio	Desv est	Promedio	Desv est	Promedio	Desv est	Promedio	Desv est
7A7	<b>1,021</b>	0,083	<b>0,423</b>	0,068	<b>0,991</b>	0,098	<b>3,428</b>	0,426
12C3	0,357	0,021	<b>0,373</b>	0,055	0,241	0,040	0,360	0,103
VHH no relacionado	0,275	0,009	0,185	0,006	0,225	0,023	0,320	0,063
sin VHH	0,246	0,036	0,174	0,010	0,204	0,031	0,301	0,102

**Unión de VHH a semillas de Arabidopsis** – Se analizó la unión de VHH a semillas sobre semillas de *Arabidopsis thaliana* fijadas y no fijadas y se analizó por microscopía. Las semillas se fijaron incubando en 4 % de paraformaldehído en ácido 1,4-piperazindietanosulfónico (PIPES) 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) 5 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la fijación, las semillas se lavaron tres veces en PBS. Se realizaron tres lavados con PBS para semillas nativas antes del marcado con fragmentos de anticuerpos. Se eliminó PBS de los pocillos y se añadieron disoluciones de 5 µg/ml de VHH en 5 % de MPBS y se incubaron durante 60-90 minutos. Se eliminaron VHH no unidos lavando cinco veces con PBS. Se detectaron VHH unidos con incubación con anticuerpos anti-histidina de ratón monoclonales directamente conjugados con el colorante fluorescente Alexa-488 (Abd Serotec) en 5 % de MPBS durante 1 h. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando cinco veces con PBS. Se pusieron semillas en portaobjetos µ de 18 pocillos y se analizaron por microscopía. Se observó la clara unión de diversos VHH a la superficie de las semillas como se ejemplifica para VHH 6D7 (Figura 1).

#### **Ejemplo 4: Unión de VHH a tejido de planta herido**

**Unión de VHH a piel de manzana dañada** – Se investigó la unión de VHH a discos de piel de manzana dañada. Se prepararon discos de piel de manzana no tratada por perforación de piel de manzana con una perforadora. Se dañó intencionadamente una serie de discos de piel de manzana haciendo cortes en la superficie externa de los discos de piel de manzana. Se investigó la unión de cada anticuerpo a piel de manzana dañada en incubaciones separadas para cada anticuerpo en comparación con piel de manzana intacta como control. Se pusieron invertidos discos de piel de manzana en pocillos de una placa multipocillo que contenía PBS. Se eliminó el PBS de los pocillos y se añadió PBS nuevo a cada pocillo. Este ciclo de lavado se repitió 2 veces. Se añadieron disoluciones que contenían 5 µg/ml de VHH en 1 % de BSA en PBS a los discos de piel y se incubaron durante 60-90 minutos. Se eliminaron VHH no unidos lavando cinco veces con PBS. Se detectaron VHH unidos por incubación con anticuerpos anti-histidina de ratón monoclonales directamente conjugados con el colorante fluorescente Alexa-488 (Abd Serotec) en 1 % de BSA en PBS durante 1 hora. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando cinco veces con PBS. Se colocaron discos de piel de manzana en placas de Petri y se analizaron por microscopía en un sistema de microscopio de macrozoom

(Nikon). Se encontró que algunos VHH, tales como VHH 6D7 y VHH 7A7, se unían predominantemente a áreas dañadas de discos de piel de manzana (Figura 2).

**Unión de VHH a hojas de planta heridas** - Se investigó la unión de VHH a discos de hoja de patata no fijados y tiras de hoja de trigo. Se prepararon discos de hoja perforando una hoja de patata fresca con una perforadora. Se prepararon trozos de hoja de trigo cortando trozos de hojas de aproximadamente 0,25 cm<sup>2</sup>. Se pusieron discos de hoja y trozos de hoja en pocillos de una placa de 96 pocillos que contenía PBS. Se eliminó PBS de los pocillos y se añadió PBS nuevo a cada pocillo. Este ciclo de lavado se repitió 2 veces. Se transfirieron discos de hoja de patata y trozos de hoja de trigo a disoluciones que contenían 5 µg/ml de VHH en 5 % de MPBS y se incubaron durante 60-90 minutos. Se eliminaron VHH no unidos lavando cinco veces con PBS. Los VHH unidos se detectaron con incubación con anticuerpos anti-histidina de ratón monoclonales directamente conjugados con el colorante fluorescente Alexa-488 (Abd Serotec) en 5 % de MPBS durante 1 hora. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando cinco veces con PBS. Se colocaron discos de hoja en portaobjetos µ de 8 pocillos y se analizaron por microscopía. Se encontró que VHH 6D7, 7A5, 7A7 y 7E9 se unían fuertemente a discos de hoja o trozos de hoja, predominantemente en sitios de tejido dañado (Figura 3), que se produjeron por perforación, o cortando hojas.

**Ejemplo 5: Unión de VHH a extractos de planta enriquecidos en polisacáridos en ELISA**

**Unión de VHH a diferentes extractos de especies de planta y polisacáridos solubles de soja en ELISA** - Se analizó la unión de VHH a extractos de hoja de planta de plantas de patata (*Solanum tuberosum* variedad Désirée), plantas de trigo (*Triticum aestivum* variedad Boldus), plantas de ballico (*Lolium perenne*), plantas de guisante (*Pisum sativum*), plantas de belladona negra (*Solanum nigrum*), y a polisacáridos solubles de soja en ELISA. Se extrajeron extractos de hoja entera enriquecidos en polisacáridos de la pared celular usando CDTA (Moller et al., 2007). Las hojas se congelaron en nitrógeno líquido y se homogeneizaron con mortero y pistilo hasta que se obtuvieron polvos finos. Se prepararon extractos enriquecidos en polisacáridos de la pared celular resuspendiendo los polvos finos en CDTA 50 mM a pH 6,5 usando 10 ml por gramo de material molido y rotación cabeza sobre cabeza a 4 °C durante 30 minutos. Se separaron el extracto y el material insoluble usando una jeringa adaptada con un filtro. Los extractos se limpiaron adicionalmente por centrifugación en una microcentrífuga a 20.000 g durante 5 minutos. Se extrajeron polisacáridos solubles en soja cruda según el método descrito por Nakamura et al. (2002) y entonces se disolvieron en tampón CDTA 50 mM a pH 6,5. Las placas de ELISA se recubrieron con extractos de CDTA diluidos 30 veces en PBS a 4 °C durante la noche. El recubrimiento continuó a temperatura ambiente durante 1 hora al día siguiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS/0,05 % de Tween-20 y se bloquearon con 5 % de leche desnatada en PBS durante 1-2 horas. Se prepararon diluciones de 5 µg/ml de VHH purificado en 1 % de MPBS/0,05 % de Tween-20. Se transfirieron diluciones de anticuerpo a las placas recubiertas de extractos de planta y se dejó que VHH se uniera durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectaron VHH unidos con incubaciones secuenciales con anticuerpos anti-histidina de ratón monoclonales (Abd Serotec) y anticuerpos de molécula entera anti-IgG de ratón de conejo conjugados con fosfatasa alcalina (RaM/AP) (Sigma) en 1 % de MPBS/0,05 % de Tween-20. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando tres veces con PBS/0,05 % de Tween-20 después de cada incubación de anticuerpo. Las placas se lavaron dos veces más con PBS y se añadieron 100 µl de sustrato de hexahidrato de sodio de pNPP (Sigma) a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 405 nm (véase la Tabla 2). Los VHH muestran claramente unión con diferente especificidad a patata, trigo, belladona negra, guisante, pasto y extractos de polisacáridos solubles de soja. Para soja se ha descrito que la fracción péctica soluble de CDTA está compuesta por ramnogalacturonano y xilogalacturonano, pero no homogalacturonano (Huisman et al., 2001). Como se usaron extractos en bruto no caracterizados en este sistema de ELISA, se evaluó la unión a diferentes muestras cualitativamente y no se hicieron comparaciones directas entre diferentes extractos.

Tabla 2: Unión de VHH a extractos de planta enriquecidos en polisacárido. Se combinaron datos de diferentes experimentos para esta visión general. Se muestran condiciones de control para cada una. Las condiciones de control incluyen investigar la unión de cada VHH a un pocillo bloqueado sin antígeno recubierto, además de investigar cualquier posible unión no específica de los anticuerpos anti-histidina y anti-IgG de ratón para cada condición de recubrimiento. Algunos clones aparecen en diferentes experimentos (6D7 y 7A5). BLNS: belladona negra. CDTA: Extracto enriquecido en polisacárido péctico. MÁS DE significa ≥ 4,000.

ID de VHH	CDTA de patata	CDTA de trigo	CDTA de BLNS	CDTA de guisante	CDTA de pasto	CDTA de soja	Sin recubrimiento
6D7	0,354	0,125					0,075
Blanco	0,076	0,075					0,075
7A7	1,487	0,213					0,105
7A5	0,670	0,141					0,075
Blanco	0,087	0,076					0,073
6D7	0,187	0,164	0,182	0,235			0,079

ID de VHH	CDTA de patata	CDTA de trigo	CDTA de BLNS	CDTA de guisante	CDTA de pasto	CDTA de soja	Sin recubrimiento
8A4	2,606	MÁS DE	MÁS DE	MÁS DE			0,079
Blanco	0,078	0,079	0,078	0,072			0,080
7A5	2,563	0,260	0,644	0,901	1,694	0,170	0,115
6D7	0,954	0,256	0,391	0,321	1,066	0,212	0,158
Blanco	0,234	0,131	0,141	0,116	0,128	0,166	0,110
8A4			MÁS DE	MÁS DE	MÁS DE	0,182	0,111
Blanco			0,304	0,147	0,347	0,188	0,118

**Ejemplo 6: Unión de VHH a componentes de la pared celular de planta en ELISA**

**Unión de VHH a polisacáridos pécticos en ELISA** – Se analizó la unión de matrices de VHH purificado a diferentes especies de pectina en ELISA. Se recubrieron placas de ELISA (Maxisorp, Nunc) con 100 µl por pocillo de 100 µg/ml de 70-75 % de pectina de manzana esterificada (Sigma), ≥ 80 % de pectina esterificada de frutas cítricas, 20-34 % de pectina esterificada de frutas cítricas (Sigma) o goma arábica (Sigma) como control negativo en PBS. Las placas se recubrieron a 4 °C durante la noche y el recubrimiento continuó a temperatura ambiente durante 1 hora al día siguiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS/0,05 % de Tween-20 y se bloquearon con 5 % de leche desnatada en PBS durante 1 hora. Se diluyeron VHH purificados a 3 µg/ml en 1 % de MPBS / 0,05 % de Tween y se añadieron a las placas recubiertas de pectina y se dejó que los VHH se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectaron VHH unidos con incubaciones secuenciales con anticuerpos anti-histidina de ratón monoclonales (Abd Serotec) y anticuerpos de molécula entera anti-IgG de ratón de conejo conjugados con fosfatasa alcalina (RaM/AP) (Sigma) en 1 % de MPBS/0,05 % de Tween-20. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando tres veces con PBS/0,05 % de Tween-20 después de cada incubación de anticuerpo. Las placas se lavaron dos veces más con PBS y se añadieron 100 µl de sustrato de hexahidrato de disodio de pNPP (Sigma) a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 405 nm y se comparó el perfil de unión obtenido de la unión para todos los clones (véase la Tabla 3A). Se observaron patrones de unión diversos y distintos para diferentes VHH.

**Unión de VHH a polisacáridos pécticos en ELISA en valoración** – Se realizó la valoración de VHH en placas de ELISA (Maxisorp, Nunc) recubiertas con 100 µl por pocillo de 100 µg/ml de 70-75 % de pectina de manzana esterificada (Sigma) o 20-34 % de pectina esterificada de frutas cítricas (Sigma) en PBS. Las placas se recubrieron a 4 °C durante la noche y el recubrimiento continuó a temperatura ambiente durante 1 hora al día siguiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS/0,05 % de Tween-20 y se bloquearon con 5 % de leche desnatada en PBS durante 1 hora. Se prepararon diluciones sucesivas de 4 veces de VHH purificados en 1 % de MPBS/0,05 % de Tween-20 en placas de polipropileno de 96 pocillos. Las concentraciones de anticuerpo oscilaron de 3 µg/ml a 12 ng/ml. Se transfirieron diluciones de anticuerpo a las placas recubiertas de pectina y se dejó que VHH se uniera durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectaron VHH unidos con incubaciones secuenciales con anticuerpos anti-histidina de ratón monoclonales (Abd Serotec) y anticuerpos de molécula entera anti-IgG de ratón de conejo conjugados con fosfatasa alcalina (RaM/AP) (Sigma) en 1 % de MPBS/0,05 % de Tween-20. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando tres veces con PBS/0,05 % de Tween-20 después de cada incubación de anticuerpo. Las placas se lavaron dos veces más con PBS y se añadieron 100 µl de sustrato de hexahidrato de disodio de pNPP (Sigma) a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 405 nm y se representó en función de la concentración de anticuerpo (véanse la Tabla 3B y 3C). VHH 7A5, VHH 7A7 y VHH 6D7 se unieron a pectina de baja esterificación en ELISA de un modo dependiente de la dosis. Las señales de unión en la pectina de alta esterificación fueron más bajas que para la pectina de baja esterificación para VHH 7A5 y VHH 7A7. VHH 6D7 no mostraron unión significativa a pectina de alta esterificación en ELISA. La unión preferencial de VHH 7A5, VHH 7A7 y VHH 6D7 a pectina de baja esterificación está de acuerdo con los datos de la matriz (Figura 4).

**Tabla 3A:** Unión de VHH a pectinas de baja y alta esterificación y goma arábica en ELISA. Se combinaron datos de diferentes experimentos para esta visión general. Se muestran condiciones de control para cada una. Las condiciones de control incluyen investigar la unión de cada VHH a un pocillo bloqueado sin antígeno recubierto, además de investigar cualquier posible unión no específica de los anticuerpos anti-histidina y anti-IgG de ratón para cada condición de recubrimiento. MÁS DE significa ≥ 4,000.

ID de VHH	Pectina de manzana, 70-75 % de esterificación	Pectina de frutas cítricas, ≥80 % esterificada	Pectina de frutas cítricas, 20-34 % esterificada	Goma arábica	Sin recubrimiento
-----------	---	--	--	--------------	-------------------

ID de VHH	Pectina de manzana, 70-75 % de esterificación	Pectina de frutas cítricas, ≥80 % esterificada	Pectina de frutas cítricas, 20-34 % esterificada	Goma arábica	Sin recubrimiento
6D7	0,092	0,078	MÁS DE	0,068	0,075
Blanco	0,076	0,077	0,080	0,073	0,075
7A7	0,501	0,104	MÁS DE	0,084	0,105
7A5	0,253	0,107	0,578	0,078	0,075
Blanco	0,077	0,084	0,075	0,070	0,073
8A4	0,087	0,133	0,093	0,081	0,084
Blanco	0,095	0,115	0,091	0,082	0,087
12C3	0,104	0,083	0,145	0,083	0,083
Blanco	0,086	0,082	0,084	0,083	0,083

**Tabla 3B:** Unión de VHH a pectina de fruta cítrica de baja esterificación en ELISA:

[VHH] (µg/ml)		3,0	0,75	0,19	0,047	0,012	0
[VHH] (nM)		200	50	13	3,1	0,78	0
20-34 % de pectina de fruta cítrica esterificada		+	+	+	+	+	+
		1	2	3	4	5	6
VHH7A5	A	<b>1,996</b>	<b>0,225</b>	0,189	0,142	0,137	0,096
VHH7A7	B	<b>4,000</b>	<b>0,980</b>	<b>0,477</b>	<b>0,219</b>	0,146	
VHH6D7	C	<b>4,000</b>	<b>0,522</b>	<b>0,226</b>	0,146	0,127	

**Tabla 3C:** Unión de VHH a pectina de manzana de alta esterificación en ELISA:

[VHH] (µg/ml)		3,0	0,75	0,19	0,047	0,012	0
[VHH] (nM)		200	50	13	3,1	0,78	0
70-75 % de pectina de manzana esterificada		+	+	+	+	+	+
		1	2	3	4	5	
VHH7A5	A	<b>0,266</b>	0,170	0,089	0,090	0,080	0,096
VHH7A7	B	<b>0,442</b>	0,161	0,102	0,100	0,082	
VHH6D7	C	0,090	0,086	0,083	0,097	0,081	

5

**Ejemplo 7: Unión de VHH en matrices de oligo- y polisacárido**

**Sondaje de matrices de oligo- y polisacárido con VHH** - Se usó una matriz de oligo- y polisacárido específica de planta para la elucidación adicional de las clases de epítopo unidas por los VHH seleccionados. Se aplicaron 36 oligosacáridos conjugados con albúmina de suero bovino (BSA) y 45 polisacáridos sobre nitrocelulosa. Sobre la matriz cada muestra se representa por cuatro manchas (dos concentraciones por duplicado). Se sondaron matrices de oligo- y polisacárido con 5 µg/ml de los VHH seleccionados y se detectaron VHH unidos con anticuerpos anti-histidina secundarios y conjugados con fosfato alcalino terciarios. Se tomaron imágenes de matrices individuales y

10

se registraron mapas de calor para las diferentes incubaciones de VHH (Figura 4). Los datos de unión mostraron que VHH fueron ligantes de pectina altamente específicos, ya que todos se unieron a muestras de pectina de lima con diferentes grados de esterificación (0 %, 11 %, 16 %, 43 % para las manchas G1, E1, H1, F1, respectivamente). La unión a la muestra de ramnagalacturonano II menos pura (mancha I2) se produjo probablemente por dominios de pectina presentes en esta muestra. Los VHH seleccionados se unen preferencialmente a pectina con grados más bajos de esterificación de metilo, sugiriendo la unión a epítopes de homogalacturonano (HG). De forma interesante, los patrones de unión de VHH fueron diferentes de los patrones de unión a anticuerpo convencionales conocidos probados en la misma matriz (es decir, JIM5 (Knox et al., 1990; Willats et al., 2000; Clausen et al., 2003), JIM7 (Knox et al., 1990; Willats et al., 2000; Clausen et al., 2003), JIM8 (Pennell et al., 1991), JIM13 (Knox et al., 1991; Yates, 1996), LM10 (McCartney et al., 2005), LM15 (Marcus et al., 2008), LM18 (Verhertbruggen et al., 2009), LM19 (Verhertbruggen et al., 2009), LM20 (Verhertbruggen et al., 2009)).

### **Ejemplo 8: Unión de VHH acoplado a microcápsulas a semillas de planta**

Con el objetivo de generar microcápsulas de poliurea funcionalizadas con VHH, se acoplaron VHH a microcápsulas con un núcleo del 1,5 % de Uvitex OB (Ciba) en benzoato de bencilo y una envoltura con lisina incorporada a grupos carboxilo expuestos en la superficie. Se usó un núcleo del 1,5 % de Uvitex OB en benzoato de bencilo para la visualización fluorescente de microcápsulas. Después de la producción de microcápsulas, se lavaron microcápsulas con agua y se guardaron como suspensiones de cápsulas en agua. Antes de acoplar VHH, las microcápsulas se lavaron con tampón MES/NaCl (MES 0,1 M / NaCl 0,5 M a pH 6) usando una placa de filtración de pocillos profundos de 96 pocillos (Millipore) y un colector de vacío (Millipore). Se dializó un panel de VHH contra tampón MES/NaCl y se añadió a una concentración final de 10-70  $\mu$ M y se incubó con las microcápsulas durante 15-30 minutos. Se disolvió clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) (Pierce) en tampón MES/NaCl y se añadió rápidamente a una concentración final de 50 mM. Se acoplaron VHH por incubación con mezcla continua a temperatura ambiente durante 2 horas. Las reacciones de acoplamiento se detuvieron añadiendo glicina o tampón Tris a pH 7,5 a una concentración final de 100 mM e incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se recogieron VHH no unidos usando el conjunto de placa de filtración usando una placa colectora de pocillos profundos. Las microcápsulas se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en PBS y se guardaron a 4 °C hasta su uso. Para demostrar que las microcápsulas se funcionalizaron acoplando VHH de unión a pectina se realizó un experimento de unión con microcápsulas a semillas de *Arabidopsis thaliana*. Para este fin, se incubaron semillas con microcápsulas acopladas a VHH, microcápsulas de blanco, o sin microcápsulas. La unión de microcápsulas a semillas se analizó microscópicamente y fluorométricamente. Brevemente, se pusieron cuatro semillas de *Arabidopsis thaliana* por pocillo en pocillos de una placa de polipropileno de 96 pocillos (Nunc). Cada condición se realizó por cuadruplicado, que consiste en 4 pocillos con 4 semillas por pocillo cada uno. Se añadieron 25  $\mu$ l de suspensiones de microcápsulas con aproximadamente  $3,8E+04$  microcápsulas a cada pocillo y se incubaron en una plataforma de agitación de ELISA a temperatura ambiente durante 1 hora. Las microcápsulas no unidas se eliminaron de las semillas pipeteando cuidadosamente para resuspender las microcápsulas y desechar los sobrenadantes. Se realizaron tres lavados con PBS. Se transfirieron semillas con microcápsulas unidas a portaobjetos  $\mu$  de 18 pocillos (Ibidi) y se analizaron microscópicamente usando epifluorescencia. Se liberó Uvitex OB de las microcápsulas unidas usando etanol, se recogieron los sobrenadantes y se midió la fluorescencia. La fluorescencia liberada de los pocillos con solo semillas se comparó con pocillos con semillas incubadas con microcápsulas de blanco y pocillos con semillas incubadas con microcápsulas con VHH 6D7 acoplado. Las mediciones de fluorescencia promedio (desviación estándar) fueron 30441 ( $\pm$  12934), 8722 ( $\pm$  4024) y 1784 ( $\pm$  238), para pocillos con semillas y microcápsulas con VHH 6D7, pocillos con semillas y microcápsulas de blanco, y pocillos con solo semillas, respectivamente, demostrando que los VHH según la presente invención pueden usarse para unir microcápsulas a semillas de planta y que esta unión aumenta sustancialmente la cantidad del contenido de microcápsulas que se retiene a las semillas de planta en comparación con las microcápsulas sin VHH según la presente invención.

**Unión de microcápsulas funcionalizadas con VHH a semillas de cultivo no tratadas** – Se investigó la unión de microcápsulas a semillas de cultivo usando semillas de arroz, trigo y maíz y microcápsulas funcionalizadas con VHH con VHH 7A7 y VHH 7A5 acoplados. Se diluyeron microcápsulas fluorescentes con un núcleo que contenía Uvitex OB a  $1E+05$  microcápsulas/ml. Se incubaron semillas y microcápsulas con rotación cabeza sobre cabeza durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS o 1 % de BSA / PBS para arroz y trigo, y semillas de maíz, respectivamente. Se eliminaron microcápsulas no unidas lavando con PBS. Las semillas con microcápsulas unidas se analizaron para microcápsulas unidas en un sistema de microscopio de macrozoom (Nikon). Se usó un filtro DAPI para visualizar las microcápsulas de Uvitex OB. Los controles para microcápsulas acopladas a VHH incluyeron microcápsulas de blanco a las que no se acoplaron VHH. Se encontró significativamente que más microcápsulas con VHH 7A7 o VHH 7A5 se unían a semillas de arroz y trigo en comparación con microcápsulas de blanco sin VHH (véase la Figura 5A para arroz y 5B para trigo). Se encontró significativamente que más microcápsulas con VHH 7A7 se unían a semillas de maíz en comparación con microcápsulas de blanco sin VHH (véase la Figura 5C). Para mediciones cuantitativas Uvitex OB se liberó de las microcápsulas unidas a semillas de maíz. Se incubaron tres semillas de maíz por condición con microcápsulas con VHH 7A7 acoplado. Se realizó la unión de semilla a microcápsula como se describe antes. Se liberó Uvitex OB de las microcápsulas unidas a semilla por incubación en 100 % de etanol con agitación vigorosa durante 5 minutos. Los sobrenadantes se recogieron y en disolución se midió la fluorescencia usando un aparato Fluostar Optima (BMG Labtech). Los controles para microcápsulas acopladas a VHH incluyeron

microcápsulas de blanco a las que no se acoplaron VHH y semillas sin microcápsulas. Los números de microcápsulas unidos a las semillas se calcularon por medio de medición de una serie de concentración estándar de microcápsulas. Los números de microcápsulas calculados con respecto a las semillas de maíz con VHH 7A7 acoplados fueron  $3,1E+02$ . Los números de microcápsulas calculados para las microcápsulas de blanco o microcápsulas con VHH de control no relacionado fueron 10 y 91, respectivamente, demostrando que VHH según la presente invención puede usarse para unir microcápsulas a semillas de planta y que esta unión aumenta sustancialmente el número de microcápsulas que se retienen a las semillas de planta en comparación con microcápsulas sin VHH según la presente invención.

**Unión de microcápsulas funcionalizadas con VHH con agente de potenciamiento de planta a semillas de cultivo no tratadas** –

A continuación se investigó si las microcápsulas funcionalizadas con VHH que contenían un agente de potenciamiento de planta podrían ser unidas y retenidas en semillas de cultivo de arroz y de trigo. Por tanto, se disolvió el insecticida piretroide lambda-cihalotrina en benzoato de bencilo y se encapsuló en microcápsulas de poliurea funcionalizadas a una carga final del 40 %. Estas microcápsulas se acoplaron posteriormente con proteínas de unión a semilla usando métodos similares como se describen en el primer párrafo de este ejemplo. Se incubaron por separado diez semillas de arroz y trigo con suspensiones de microcápsulas que contenían  $1E+05$  microcápsulas / ml en PBS con rotación de cabeza sobre cabeza durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminaron las microcápsulas no unidas lavando con PBS. Las semillas lavadas con microcápsulas unidas se transfirieron a viales de vidrio y las microcápsulas se disolvieron en acetona para liberar lambda-cihalotrina. Las muestras se diluyeron mediante adición de hexano que contenía # 0,05 % de fosfato de trifenilo como patrón interno. La cantidad de lambda-cihalotrina se determinó por análisis de GC/MS-MS en comparación con disoluciones de calibración. Se midieron 0,34 mg/kg de lambda-cihalotrina (correspondiente a  $1,3E+04$  microcápsulas) sobre semillas de arroz tratadas con microcápsulas acopladas a VHH 6D7; mientras que solo se detectaron 0,25 mg/kg de lambda-cihalotrina (correspondiente a  $9,6E+03$  microcápsulas) en semillas de arroz tratadas con microcápsulas acopladas con un VHH de control con una afinidad más baja por semillas de arroz. De modo similar, se midieron 0,53 mg/kg de lambda-cihalotrina (correspondiente a  $2,0E+05$  microcápsulas) en semillas de trigo tratadas con microcápsulas acopladas a VHH 6D7, mientras que solo se detectaron 0,43 mg/kg de lambda-cihalotrina (correspondiente a  $1,7E+04$  microcápsulas) en semillas de trigo tratadas con microcápsulas acopladas a un VHH de control con una afinidad más baja por semillas de trigo. Basándose en estos resultados, los presentes inventores llegan a la conclusión de que los VHH según la presente invención son capaces de unirse eficientemente y retener un agente de potenciamiento de planta (en el caso: lambda-cihalotrina) comprendido en microcápsulas, a la superficie de las semillas, y que las cantidades de agente de potenciamiento de planta presentes en las semillas se correlacionan con la afinidad de unión y especificidad de los VHH usados.

Será evidente para el experto en la materia que la eficacia de una composición de tratamiento de semillas según la invención, que comprende un agente de potenciamiento de planta, puede evaluarse del siguiente modo: primero, una composición para el tratamiento de semillas según la invención que comprende un agente de potenciamiento de planta se aplica a una o más semillas adecuadas; posteriormente, dicha semilla tratada se siembra en la tierra o en una maceta que contiene tierra y con el tiempo la cantidad del agente de potenciamiento de planta presente sobre la semilla o en la planta de semillero (en el caso de un agente de potenciamiento de planta sistémico) se mide con el tiempo usando métodos analíticos adecuados. Se apreciará que la cantidad de agente de potenciamiento de planta presente en la semilla, tratada con una composición según la invención, es más alta que la cantidad de agente de potenciamiento de planta presente en una semilla, tratada con una composición de tratamiento de semillas similar, que carece de una proteína de unión a semilla según la invención. Alternativamente, la semilla tratada sembrada se expone a patógenos transmitidos por la tierra o la planta emergente de semillero se expone a plagas u organismos de enfermedad y se monitoriza el daño causado a la planta emergente con el tiempo usando cualquier método adecuado conocido por el experto en la materia, que incluye, pero no se limita a, inspección visual de la parte de planta que está afectada. Se apreciará que la cantidad de daño a la planta de semillero, tratada con una composición según la invención, es inferior a la cantidad de daño a la planta de semillero, tratada con una composición de tratamiento de semillas similar, que carece de una proteína de unión a semilla según la invención.

**Ejemplo 9: Unión de VHH acoplado a microcápsulas a fruta dañada y tejido de planta herido**

Se usó un ensayo de unión con discos de piel de manzana para investigar la unión de microcápsulas funcionalizadas con VHH a fruta dañada. Se usó un ensayo de unión con discos de hoja de patata para investigar la unión de microcápsulas funcionalizadas con VHH a tejido de planta herida. Se prepararon discos de piel de manzana no tratada perforando la piel de manzana con una perforadora. Se dañó intencionadamente una serie de discos de piel de manzana haciendo cortes sobre la superficie externa de discos de piel de manzana. Se prepararon discos de hoja de patata no tratada (variedad Désirée) perforando hojas con una perforadora. Se dañó intencionadamente una serie de discos de hoja de patata haciendo cortes en la superficie superior de los discos de hoja de patata. Se investigó la unión de microcápsulas con diferentes VHH acoplados en incubaciones separadas para cada condición. Se pusieron discos de piel de manzana o discos de piel de patata hacia arriba en pocillos de una placa multipocillo. Las microcápsulas que contenían Uvitex OB se diluyeron a densidades apropiadas en 1 % de leche desnatada en PBS con 0,05 % de Tween-20. Se añadieron microcápsulas a los discos de piel de manzana y hoja de patata y se permitió la sedimentación de microcápsulas y la unión durante 1 hora. Se eliminaron las microcápsulas no unidas lavando con PBS con 0,05 % de Tween-20. Se analizaron discos de piel de manzana y de hoja de patata para

microcápsulas unidas en un sistema de microscopio de macrozoom (Nikon). Se usó un filtro DAPI para visualizar microcápsulas de Uvitex OB. Los controles para microcápsulas acopladas a VHH incluyeron microcápsulas de blanco a las que no se acoplaron VHH y microcápsulas a las que se acoplaron VHH no relacionados. Basándose en los resultados del ensayo de unión de discos de piel de manzana y de hoja de patata con microcápsulas de Uvitex OB se encontró que algunos de los VHH (por ejemplo, VHH 6D7) de la presente invención demostraron ser capaces de unir y retener microcápsulas específicamente en sitios de daño en fruta o tejido dañado en plantas (Figura 6).

## REFERENCIAS

- 5 - Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- 10 - Blake, A.W., McCartney, L., Flint, J., Bolam, D.N., Boraston, A.B., Gilbert, H.J. y Knox, J.P. (2006) Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding molecules in prokaryotic enzymes. *J. Biol. Chem.* 281, 29321-29329.
- 15 - Clausen, M.H., Willatsz, W.G. y Knox, J.P. (2003). Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of antihomogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *Carbohydr. Res.* 338, 1997-1800.
- Cozens-Roberts, C., Quinn, J.A., Lauffenburger, D.A. (1990) Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. *Biophys. J.* 58, 857-872.
- Dimitrov, D.S. (2009) Engineered CH2 domains (nanoantibodies). *mAbs* 1, 26-28.
- Fipula, D. (2007). Antibody engineering and modification techniques. *Biomolecular Engineering* 24, 201-205.
- 20 - Fritz, J. (2008). Cantilever biosensors. *Analyst*, 133, 855-863.
- Goulao, L.F. (2010). Pectin de-esterification and fruit softening: revisiting a classical hypothesis. *Stewart postharvest Review* 6, 1-12.
- Harris, B. (1999). Exploiting antibody-based technologies to manage environmental pollution. *Trends Biotechnol.*, 17, 290-296.
- 25 - Huisman, M.M.M., Fransen, C.T.M., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G., Schols, H.A. y Voragen, A.G.J. (2001) The CDTA-soluble pectic substances from soybean meal are composed of rhamnogalacturonan and xylogalacturonan but not homogalacturonan. *Biopolymers*, 58, 279-294.
- Knox, J.P., Linstead, P.J., King, J., Cooper, C. y Roberts, K. (1990). Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta*, 181: 512-521.
- 30 - Knox, J.P., Linstead, P.J., Peart, J., Cooper, C. y Roberts, K. (1991). Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant J.* 1, 317-326.
- Kolmar, H. (2008) Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cysteine-knot miniproteins. *FEBS J.* 275, 2684-2690.
- 35 - Marcus, S.E., Verherbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J.J., Farkas, V., Pedersen, H.L., Willats, W.G. y Knox, J.P. (2008). Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol.* 8, 60.
- Marquette C.A., y Blum, L.C. (2006). State of the art and recent advances in immunoanalytical system. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1424-1433.
- 40 - McCartney, L., Marcus, S.E. y Knox, J.P. (2005). Monoclonal antibodies to plant cell wall and arabinoxylans. *J. Histochem. Cytochem.*, 53,543-546.
- Moller, I., Sørensen, I., Bernall, A.J., Blaukopf, C., Lee, K., Øbro, J., Pettolino, F., Roberts, A., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., Bacic, A. y Willats, W. (2007). High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *The Plant Journal*, 50, 1118-1128.
- 45 - Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Takao, T. y Nagamatsu, Y. (2002) Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1301-1313.
- Nygren, P-A. (2008) Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J.* 275, 2668-2676.

- Øbro, J, Sørensen, I, Derkx, P., Madsen, C.T., Drews, M., Willer, M., Mikkelsen, J.D., y Willats, W.G.T. (2009). High-throughput screening of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase variants using carbohydrate microarrays. *Proteomics* 9, 1861-1868
- 5 - Pennell, R.I., Janniche, L., Kjelbom, P., Scofield, G.N., Peart, J.M. y Roberts, K (1991). Developmental regulation of plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. *Plant cell*, 3, 1317-1326.
- Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: anticalins – harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.* 275, 2677-2683.
- Skottrup, P.D., Nicolaisen, M. y Justesen, A.F. (2008). Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 339-348.
- 10 - Tramontano, A., Bianchi, E., Venturini, S., Martin, F., Pessi, A y Sollazzo, M. (1994) The making of the minibody: an engineered beta-protein for the display of conformationally constrained peptides. *J. Mol. Recognition* 7, 9-24.
- Verhertbruggen, Y., Marcus, S.E., Haeger, A., Ordaz-Oritz, J.J. y Knox, J.P. (2009). An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturan. *Carbohydr. Res.* 344, 1858-1862.
- Willats, W.G. y Knox, J.P. (1999). Immunoprofiling of pectic polysaccharides. *Anal. Biochem.* 268, 143-146.
- 15 - Willats, W.G., Limberg, G., Buchholt, H.C., van Alebeek, G.J., Benen, J., Chritensten, T.M., Visser, J., Voragen, A., Mikkelsen, J.D. y Knox, J.P. (2000). Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides and enzymatic degradation. *Carbohydr. Res.* 327, 309-320
- 20 - Yates, E.A., Valdor, J.F., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., Mackie, W. y Knox, J.P. (1996). Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology*, 6, 131-139.
- Zayas, P.T., Geissler, G. y Hernandez F. (2007). Chemical oxygen demand reduction in coffee wastewater through chemical flocculation and advanced oxidation process. *J. Environ. Science* 19, 300-305.
- 25 - Zheng, M., Toledo, R. y Wicker, L. (1999). Effect of phosphate and pectin on quality and shelf-life of marinated chicken breast. *J. Food Quality*, 22, 553-564.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> VIB VZW

VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL

Jongedijk, Erik

30

<120> Composiciones para el tratamiento de semillas

<130> VIB/PEC/352a

35

<150> US 61/402.307

<151> 26-08-2010

<150> EP 10175543.7

<151> 07-09-2010

40

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5



<210> 1

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<223> 6B5

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(30)

<223> FR1

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (31)..(35)

<223> CDR1

20

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (36)..(49)

<223> FR2

25

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (50)..(66)

<223> CDR2

30

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (67).. (98)

<223> FR3

35

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (99)..(104)

<223> CDR3

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (105)..(115)

<223> FR4

10 <400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Arg  
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Thr Leu Asn Trp Asp Gly Asp Ser Ala Ser Tyr Thr Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ser Ile Gly Thr Ile Arg Gly Ser Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 2

<211> 125

15 <212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<223> 6D7

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

5 <222> (1)..(30)

<223> FR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <222> (31)..(35)

<223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

15 <222> (36)..(49)

<223> FR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

20 <222> (50)..(66)

<223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

25 <222> (67)..(98)

<223> FR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

30 <222> (99)..(114)

<223> CDR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

35 <222> (115)..(125)

<223> FR4

ES 2 634 547 T3

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Val Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Thr Arg Ser Gly Ala Val Pro Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Ser Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Met Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Arg Ser Leu Ser Gly Arg Val Ala Gly Gln Glu Tyr Glu Tyr  
 100 105 110  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

5 <210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> Lama glama

10 <220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<223> 6D11

<220>

15 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(30)

<223> FR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (31)..(35)

<223> CDR1

5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (36)..(49)

<223> FR2

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (50)..(66)

<223> CDR2

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (67).. (98)

<223> FR3

20

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (99)..(104)

<223> CDR3

25

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (105)..(115)

<223> FR4

30

<400> 3

ES 2 634 547 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Phe Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Arg  
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Leu Asn Arg Asp Gly Asp Ser Ala Ser Tyr Thr Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ser Ile Gly Thr Ile Arg Gly Ser Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 4

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <223> 6F2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(30)

15 <223> FR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (31)..(35)

20 <223> CDR1

ES 2 634 547 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (36)..(49)

<223> FR2

5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (50)..(66)

<223> CDR2

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (67)..(98)

<223> FR3

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (99)..(104)

<223> CDR3

20

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (105)..(115)

<223> FR4

25

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Arg  
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

ES 2 634 547 T3

Ser Thr Leu Asn Arg Asp Gly Asp Ser Ala Ser Tyr Thr Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ser Ile Gly Thr Ile Arg Gly Ser Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 5

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <223> 6H4

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(30)

15 <223> FR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (31)..(35)

20 <223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (36)..(49)

25 <223> FR2



<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (50)..(66)

<223> CDR2

5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (67).. (98)

<223> FR3

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (99)..(104)

<223> CDR3

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (105)..(115)

<223> FR4

20

<400> 5

ES 2 634 547 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Arg  
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Leu Asn Arg Asn Gly Asp Ser Ala Ser Tyr Thr Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ser Ile Gly Thr Ile Arg Gly Ser Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 6

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <223> 7A5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(30)

15 <223> FR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (31)..(35)

20 <223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (36)..(49)

<223> FR2

5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (50)..(66)

<223> CDR2

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (67).. (98)

15

<223> FR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (99)..(104)

20

<223> CDR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (105)..(115)

25

<223> FR4

<400> 6

ES 2 634 547 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Arg  
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Leu Asn Arg Asp Gly Asp Ser Ala Ser Tyr Thr Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ser Ile Gly Thr Ile Arg Gly Ser Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 7

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <223> 7A7

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(30)

15 <223> FR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (31)..(35)

<223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

5 <222> (36)..(49)

<223> FR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <222> (50)..(66)

<223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

15 <222> (67).. (98)

<223> FR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

20 <222> (99)..(113)

<223> CDR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

25 <222> (114)..(124)

<223> FR4

<400> 7

ES 2 634 547 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Ala Asp Arg Glu Phe Val  
35 40 45

Ala Ala Val Ser Trp Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Pro Val Tyr Gly Thr Ala Pro Thr Thr Val Arg Ser Arg Ser Asp  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 8

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <223> 7E9

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(30)

15 <223> FR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (31)..(35)

20 <223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (36)..(49)

<223> FR2

5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (50)..(66)

<223> CDR2

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (67)..(98)

<223> FR3

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (99)..(113)

<223> CDR3

20

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (114)..(124)

<223> FR4

25

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1                      5                      10                      15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Arg Tyr  
                     20                      25                      30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Ala Asp Arg Glu Phe Val  
                     35                      40                      45

ES 2 634 547 T3

Ala Ala Val Ser Trp Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Gly Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Pro Val Tyr Gly Thr Ala Pro Thr Thr Val Arg Ser Arg Ser Asp  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 9

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <223> 8A4

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(30)

15 <223> FR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (31)..(35)

20 <223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (36)..(49)

25 <223> FR2



<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (50)..(65)

<223> CDR2

5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (66)..(97)

<223> FR3

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (98)..(113)

<223> CDR3

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (114)..(120)

<223> FR4

20

<400> 9

ES 2 634 547 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ala Cys Thr Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
           20                   25                   30  
 Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val  
           35                   40                   45  
 Ala Ala Ile Ala Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gly Asp Ala Val Lys  
           50                   55                   60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65                   70                   75                   80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
           85                   90                   95  
 Ala Lys Glu Val Arg Ser Thr Glu Thr Ser Tyr Arg Val Gln Asn Asn  
           100                   105                   110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
           115                   120

<210> 10

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <223> 8D6

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(30)

15 <223> FR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (31)..(35)

<223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

5 <222> (36)..(49)

<223> FR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <222> (50).. (65)

<223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

15 <222> (66)..(97)

<223> FR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

20 <222> (98)..(113)

<223> CDR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

25 <222> (114)..(120)

<223> FR4

<400> 10

ES 2 634 547 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Thr Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
 20 25 30

Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ala Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gly Asp Ala Val Lys  
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95

Ala Lys Glu Val Arg Ser Thr Gly Thr Ser Tyr Arg Val Gln Asn Asn  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 11

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <223> 12C3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(30)

15 <223> FR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (31)..(35)

<223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

5 <222> (36)..(49)

<223> FR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <222> (50)..(66)

<223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

15 <222> (67)..(99)

<223> FR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

20 <222> (100)..(118)

<223> CDR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

25 <222> (119)..(121)

<223> FR4

<400> 11

ES 2 634 547 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Glu Asp Leu Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Ala Lys Ala Gln Asp Leu Arg Tyr Asn Ser Arg Ser Tyr Tyr Tyr  
100 105 110

Thr Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 12

5 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador

<400> 12

gtcctggctg ctcttctaca agg

23

15 <210> 13

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 13

5 cctggctgct cttctacaag gtg 23

<210> 14

<211> 23

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

15 <400> 14

ggtaoqtoqct gttgaactgt tcc 23

<210> 15

<211> 29

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

25

<400> 15

gatgtgcagc tgcaggagtc tggrrggagg 29

<210> 16

30 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador

ES 2 634 547 T3

<400> 16

ggactagtgc ggccgctgga gacggtgacc tgggt

35

<210> 17

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador

<400> 17

ttatgcttcc ggctcgtatg

20

15 <210> 18

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador

<400> 18

ccacagacag ccctcatag

19

25



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición para el tratamiento de semillas que comprende una proteína de unión a semilla de planta, en la que dicha proteína de unión a semilla de planta es una proteína de unión al antígeno, en la que dicha proteína de unión al antígeno comprende una secuencia de VHH, en la que dicho VHH se une a pectina que comprende homogalacturonano de baja esterificación, en la que dicha proteína de unión a semilla de planta es capaz de unir un agente de potenciamiento de planta a la semilla de planta.
2. La composición para el tratamiento de semillas según la reivindicación 1, en la que dicha proteína de unión a semilla de planta comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No 1-SEQ ID No 11.
- 10 3. Un método de tratamiento de una semilla de planta, comprendiendo dicho método (1) preparar una composición para el tratamiento de semillas según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y (2) aplicar dicha composición a la semilla de planta.
4. Una semilla de planta, tratada con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que dicha proteína de unión a semilla de planta está unida a dicha semilla de planta.
- 15 5. Una semilla de planta, tratada por un método según la reivindicación 3, en la que dicha proteína de unión a semilla de planta está unida a dicha semilla de planta.
6. Un método que comprende las etapas de (i) tratar una semilla con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, y (ii) sembrar la semilla tratada, en la que dicha composición:
  - (a) protege la semilla de planta y/o la planta emergente de semillero contra patógenos transmitidos por semilla y/o transmitidos por la tierra; y/o
  - 20 (b) protege la planta que crece a partir de la semilla tratada y/o en la vecindad inmediata de la semilla tratada contra el daño producido por plagas y/o enfermedad; y/o
  - (c) protege la semilla de planta y/o la planta que crece a partir de la semilla tratada y/o en la vecindad inmediata de la semilla tratada contra el daño producido por malas hierbas y/u otras plantas no deseadas; y/o
  - 25 (d) potencia el rendimiento de la planta que crece a partir de la semilla tratada y/o en la vecindad inmediata de la semilla tratada.
7. Una proteína de unión a semilla, en la que dicha proteína de unión a semilla es una proteína de unión al antígeno que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones complementarias, y que comprende una secuencia de unión de VHH a pectina que comprende homogalacturonano de baja esterificación, en la que dicha proteína de unión a semilla es capaz de unir un agente de potenciamiento de planta a la semilla de planta.
- 30 8. El uso de una proteína de unión a semilla según la reivindicación 7 para unir un agente de potenciamiento de planta a una semilla de planta.
9. Una composición agroquímica, que comprende al menos una proteína de unión a semilla según la reivindicación 7.
- 35 10. Un agente de direccionamiento capaz de unir un compuesto a una semilla de planta, en el que dicho agente de direccionamiento comprende al menos una proteína de unión a semilla según la reivindicación 7.
11. El uso de un agente de direccionamiento según la reivindicación 10 para unir un agente de potenciamiento de planta a una planta o parte de planta.
12. Una composición agroquímica, que comprende un agente de direccionamiento según la reivindicación 10.
- 40 13. La composición para el tratamiento de semillas según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que dicha semilla de planta es una semilla de un cultivo.

Figura 1

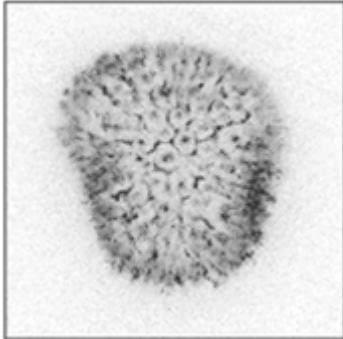


Figura 2

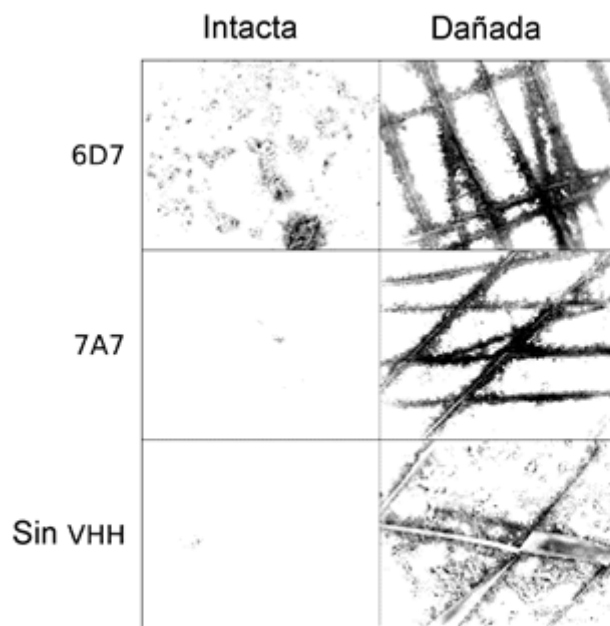


Figura 3

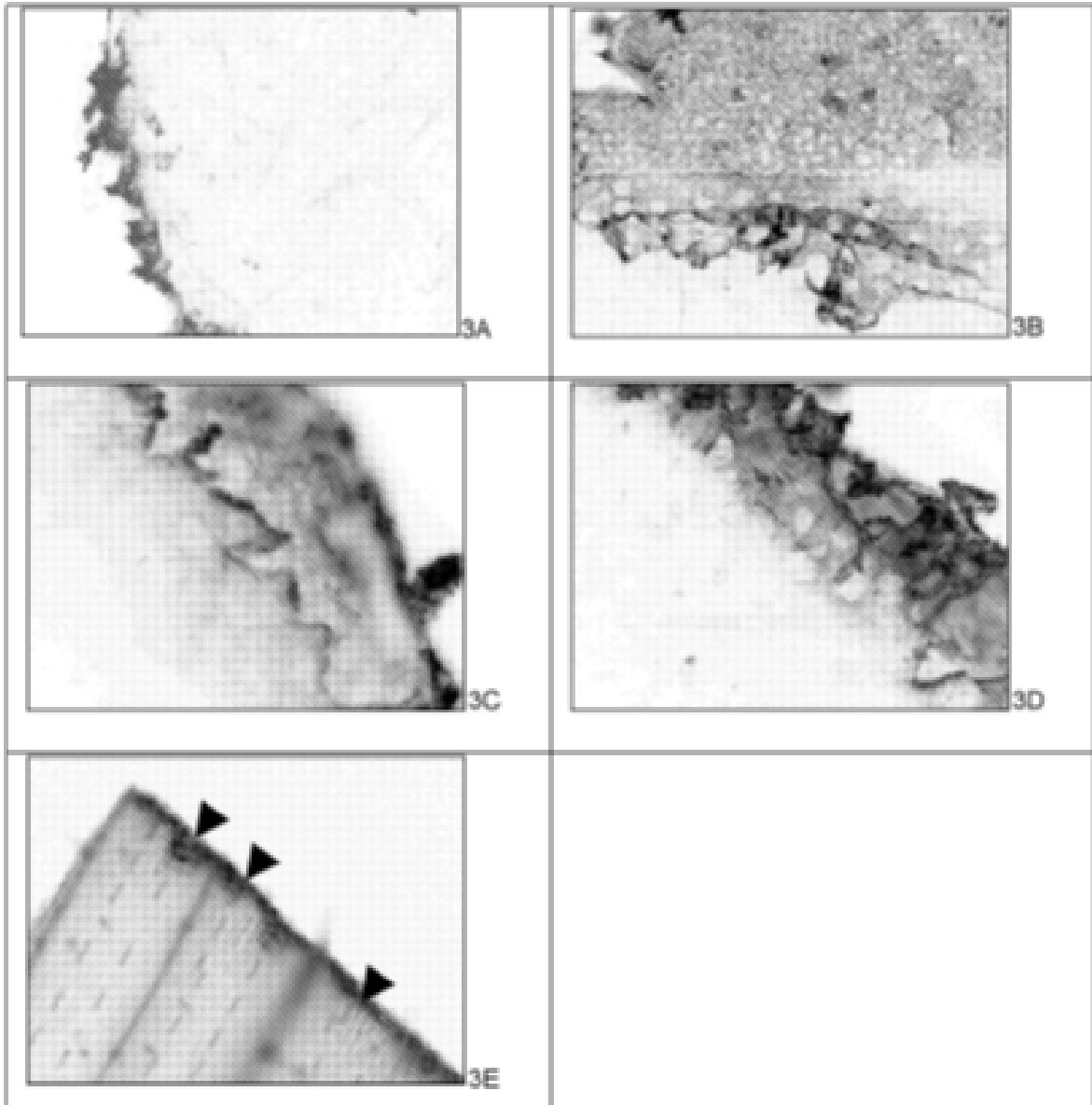
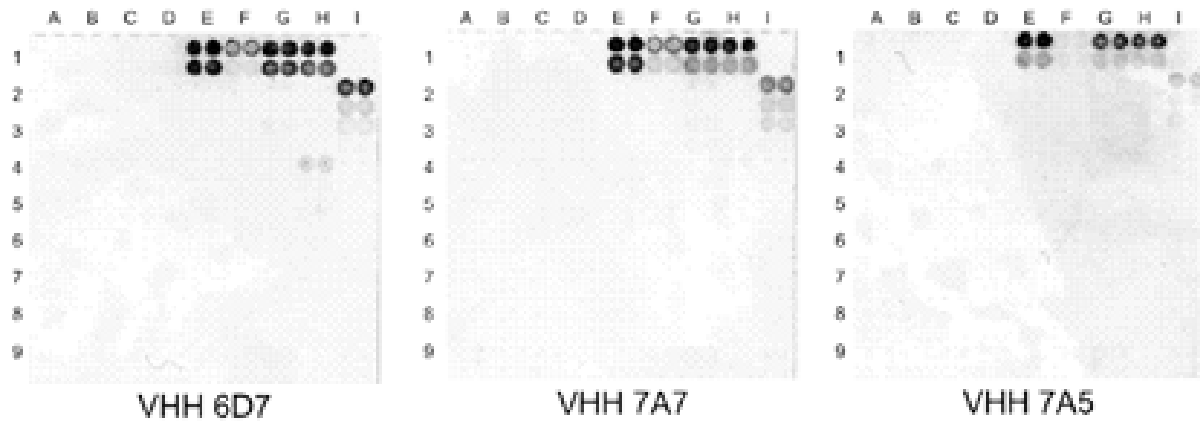


Figura 4



- E1 Pectina de lima, DE 11%
- F1 Pectina de lima, DE 43%
- G1 Pectina de lima, DE 0%
- H1 Pectina de lima, DE 16%
- I2 Pectina enriquecida en RGII (vino tinto)
- I3 Mucilago de semilla (*Arabidopsis*)
- H4 RGI N.º5 (patata)

Figura 5

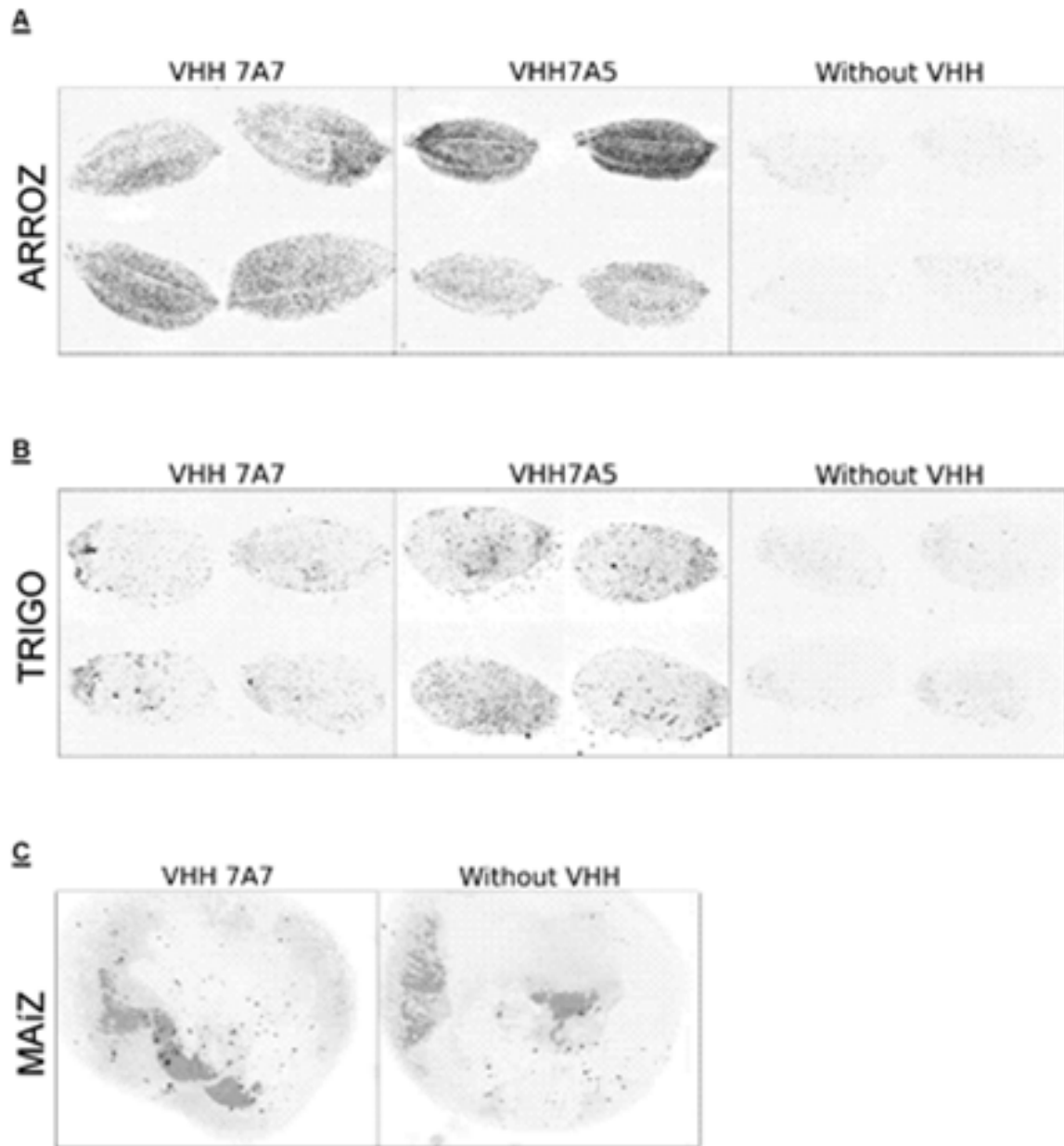


Figura 6

