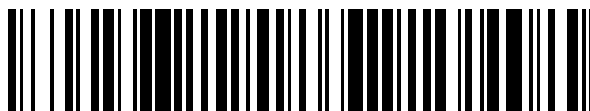


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 408**

51 Int. Cl.:

A01N 25/04 (2006.01)

A01N 25/24 (2006.01)

A01N 37/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2015 PCT/EP2015/080922**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016 WO16134806**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2015 E 15817337 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3261435**

54 Título: **Sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal**

30 Prioridad:

24.02.2015 DE 102015203317

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

24.10.2019

73 Titular/es:

**RHEINISCH-WESTFÄLISCHE TECHNISCHE
HOCHSCHULE AACHEN (RWTH) (100.0%)
Templergraben 55
52062 Aachen, DE**

72 Inventor/es:

**JAKOB, FELIX;
PICH, ANDRIJ;
RÜBSAM, KRISTIN;
CONRATH, UWE;
SÖZER, NURSEN y
SCHWANEBERG, ULRICH**

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 728 408 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

Sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal

- 5 La presente invención se refiere a un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal que comprende al menos un péptido de anclaje para la unión a una parte de una planta, una función de soporte que está unida directa o indirectamente al péptido de anclaje y al menos una sustancia activa para proteger la planta y/o promover el crecimiento de la planta. La presente invención se refiere además al uso de un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la presente invención para inmovilizar una sustancia activa para
- 10 proteger la planta y/o promover el crecimiento de la planta. Adicionalmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para proteger las plantas y/o promover el crecimiento de las plantas, en el que el sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la presente invención se aplica a una planta.

Debido al aumento de la población mundial, existe una demanda creciente de alimentos y otros productos vegetales.

- 15 Al mismo tiempo, la introducción de fertilizantes y productos de protección vegetal supone un aumento de la contaminación de los suelos, las aguas subterráneas y el medio ambiente. Además, también por motivos económicos, es deseable controlar el uso de la protección vegetal y los promotores del crecimiento vegetal, de tal manera que se usen tan específicamente como sea posible, de forma que, de hecho, se requieran solamente las menores cantidades posibles. Adicionalmente, un aporte excesivo de ciertos agentes no puede ser beneficioso para
- 20 la protección vegetal o el crecimiento vegetal.

Los péptidos antimicrobianos se conocen en la técnica anterior, por ejemplo, de Yeaman M. R. y Yount N. Y. (2003), *Pharmacol Rev.* 55: 27, páginas 27 a 55.

- 25 Además, en la técnica anterior se conocen péptidos de anclaje que pueden conferir una mejor unión a ciertas superficies; véase Muhammad N., Dworeck T., Schenk A., Shinde P., Fioroni M. y Schwaneberg U. (2012). *Polymersome surface decoration by an EGFP fusion protein employing Cecropin A as peptide "anchor"*. *J Biotechnol.*, enero de 2012, 31-37.
- 30 También se conocen sistemas que constan de un péptido de anclaje que conecta los denominados "complejos de carga", por ejemplo, sustancias activas, con nanopartículas, así como su uso en mamíferos y plantas (véase el documento WO 2009/151788).

Sin embargo, en la técnica anterior no se conoce ningún sistema con el que, adaptado de manera flexible a un gran

35 número de superficies vegetales, puedan aplicarse fiablemente y, en particular, con una mayor duración de la adhesión frente a la lluvia, medios para influir de forma positiva en la sanidad vegetal y/o el crecimiento vegetal.

En este contexto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema para la protección vegetal y/o la promoción del crecimiento vegetal, con el cual las sustancias activas destinadas a las plantas puedan aplicarse

40 sobre las plantas con una adhesión mejorada.

Este objetivo se consigue mediante un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal que comprende al menos un péptido de anclaje para una mayor unión a una parte de una planta, una función de soporte que está unida directa o indirectamente al péptido de anclaje y una sustancia activa para proteger la planta y/o

45 promover el crecimiento de la planta, en particular, el rendimiento.

En el contexto de la presente solicitud, como protección vegetal se entienden todas las medidas que protegen una planta contra una enfermedad y/o plaga. Además, la protección contra un estrés abiótico, como la sequía, también puede entenderse dentro del término protección vegetal.

- 50 Como promoción del crecimiento vegetal se entiende cualquier medida que apoye la producción de más biomasa por una planta. Esto se aplica en particular al aumento del rendimiento de los cultivos.

- En el contexto de la presente solicitud, un péptido de anclaje es un polipéptido (incluido un oligopéptido) que causa
- 55 una mayor unión del resto de la molécula asociada al mismo a una parte de una planta.

- Los péptidos de anclaje preferidos son, en particular, segmentos de cadenas anfífilas con tamaños de 2 a 300, más preferentemente de 10 a 200, de manera particularmente preferente de 15 a 150 aminoácidos, que pueden ser muy diversos en cuanto a estructura y composición. Las estructuras preferidas son hélice α , hoja plegada β y/o regiones
- 60 con un mayor número de aminoácidos específicos, en particular prolina o tirosina, y/o una combinación de

estructuras de hélice α y hoja plegada β .

Una mayor unión en el contexto de la presente invención es una unión que hace que, en una prueba de eliminación por lavado según el ejemplo 1, permanezca sobre una planta o una parte de una planta al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, aún más preferentemente al menos el 80 %, lo más preferentemente al menos el 90 % más de la sustancia activa aplicada (véase también a continuación) en comparación con la misma sustancia activa aplicada sin el péptido de anclaje. Los porcentajes se refieren al número de moléculas de la sustancia activa.

10 En el contexto de la presente solicitud, una función de soporte es una región del sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la presente invención que ni tiene una función de unión a la estructura diana de la planta ni una función de sustancia activa.

En el contexto de la presente solicitud, una sustancia activa es un compuesto natural o sintético, un sistema biológico, hasta un microorganismo, que en cada caso ejerce un efecto sobre el crecimiento y/o la sanidad de la planta. En el contexto de la presente solicitud, la sustancia activa está unida directamente a la función de soporte, en que la unión puede ser en forma de una unión química o física. En el contexto de la presente solicitud, el término unión física incluye también un caso en el que la sustancia activa está encapsulada por la función de soporte.

20 Por consiguiente, la solución según la presente invención representa un sistema de al menos tres partes. El péptido de anclaje sirve para unir la sustancia activa a la planta. De este modo, el tiempo de residencia de la sustancia activa sobre la planta aumenta. Adicionalmente, mediante la selección de un péptido de anclaje apropiado, es posible determinar el sitio de acción exacto en la planta, por ejemplo, la parte de la planta. Así, es posible seleccionar el péptido de anclaje para ciertas plantas y partes de las plantas, al igual que un sistema de construcción de bloques. Una selección semejante es posible para el experto en la materia por medio de péptidos de anclaje conocidos y por medio de una adaptación correspondiente de la cadena polipeptídica del péptido de anclaje al fin deseado. Preferentemente, el péptido de anclaje está diseñado para unirse a una superficie hidrófoba de una planta. En este contexto, una superficie hidrófoba significa, en caso de duda, que una pequeña gota de agua sobre una superficie hidrófoba tiene un ángulo de contacto $\geq 65^\circ$, preferentemente $\geq 70^\circ$, más preferentemente $\geq 75^\circ$, aún más preferentemente $\geq 80^\circ$, aún más preferentemente $\geq 85^\circ$, lo más preferentemente $\geq 90^\circ$, en una medición estática.

La función de soporte sirve para conectar la sustancia activa con el péptido de anclaje y, opcionalmente, para inmovilizarla. La función de soporte también puede adaptarse según los requisitos del sistema aplicado según la invención. Esto se aplica tanto a la sustancia activa, como a la unión del péptido de anclaje y al modo de acción deseado del compuesto activo. Así, como ejemplo, puede ser deseable que la sustancia activa permanezca a cierta distancia de la superficie de la planta. Esto se aplica, en particular, a sustancias activas que están destinadas a repeler organismos dañinos. La función de soporte separa regularmente en el espacio las funciones del péptido de anclaje y la sustancia activa.

En el contexto de la presente solicitud, se prefiere que el péptido de anclaje conste de 2 a 300 aminoácidos, más preferentemente de 2 a 250, aún más preferentemente de 2 a 180, aún más preferentemente de 5 a 140 y de manera particularmente preferente de 10 a 100 aminoácidos. En este contexto, los péptidos de anclaje particularmente preferidos son secuencias peptídicas que corresponden a las secuencias SEQ 1 a 48 o secuencias con un emparejamiento de al menos el 30 %, preferentemente de al menos el 50 %, preferentemente de al menos el 65 %, preferentemente de al menos el 75 %, preferentemente de al menos el 80 %, más preferentemente de al menos el 90 % con las secuencias SEQ 1 a 48.

El péptido de anclaje abarca aquellos aminoácidos que se proporcionan en el extremo del sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la invención (que preferentemente no está ramificado) que se encuentra opuesto a la sustancia activa. En el contexto de la presente invención, los aminoácidos del péptido de anclaje abarcan todos los aminoácidos en este extremo, hasta el último aminoácido que se une a la parte de la planta. Si hay aminoácidos no de unión (es decir, aquellos que no participan en el proceso de unión a la planta) presentes detrás del aminoácido mencionado anteriormente (es decir, alejado de la sustancia activa en la cadena aminoacídica), por ejemplo, en forma de bucles o similares, se prefiere, dentro del significado de la presente invención, que estos segmentos de cadena no de unión no se cuenten en el número total de aminoácidos del péptido de anclaje cuando la cadena no de unión consta de al menos 15 aminoácidos consecutivos que no están en contacto con la superficie de la planta.

60 Se prefiere un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la invención en el que la

sustancia activa se selecciona del grupo que consta de:

- pesticida, en particular acaricida, ovicida, insecticida, molusquicida, nematocida, rodenticida y/o avicida;
 - herbicida, en particular alguicida, gramínicida y/o arboricida;
 - 5 - bactericida;
 - fungicida;
 - fitoprotector;
 - organismos beneficiosos, en particular bacterias beneficiosas (por ejemplo, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal tales como tipos de bacilos) y hongos beneficiosos (por ejemplo, tipos de *Trychoderma*,
 - 10 micorrizas) que colonizan las raíces de las plantas y/o crecen en la rizosfera y que, opcionalmente, tienen un efecto positivo sobre la resistencia, la resistencia a enfermedades, el crecimiento y/o el rendimiento de las plantas;
 - medios para promover el crecimiento vegetal y/o la colonización de organismos beneficiosos; y
 - agentes de crecimiento vegetal, en particular nutrientes u hormonas.
- 15 Las sustancias activas particularmente preferidas para la presente invención son fungicidas de estrobilurina, azoles, inhibidores de succinato-deshidrogenasa y péptidos antimicrobianos, en particular tanatina, osmotina, dermaseptina S1, metschenikowina, defensinas y proteínas antimicrobianas, en particular, proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), osmotina, filoplanina o lipasas GDGL.
- 20 Se da preferencia a un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la invención, en el que la función de soporte se selecciona del grupo que consta de nanogel, microgel, polisoma, polimerosoma, sintosoma, espaciador poliaminoacídico, coloidosoma y cubosoma.

La función de soporte puede estar unida directa e indirectamente al péptido de anclaje. Si la función de soporte es un nanogel/microgel, se prefiere que la función de soporte esté indirectamente unida al péptido de anclaje. Esto significa que en tales casos se prefiere la aplicación de un espaciador adicional.

En el contexto de la presente solicitud, un espaciador es un elemento (adicional) (preferentemente una cadena polipeptídica), que proporciona espaciamiento entre la función de soporte y el péptido de anclaje. Preferentemente, el espaciador está diseñado en forma de una hélice α rígida. Más preferentemente, un espaciador tal es una polialanina.

Tal como se describe anteriormente, la sustancia activa está unida física o químicamente a la función de soporte. Preferentemente, la función de soporte está representada por un nanogel o un microgel. Los nanogeles y microgeles son partículas de polímeros reticulados que se hinchan en agua. Los nanogeles contienen partículas con un tamaño de 50 nm a 200 nm (con respecto al promedio estadístico del tamaño de partícula, en que, en caso de duda, para la determinación del tamaño de partículas no esféricas se considera el mayor diámetro). En el contexto de la presente solicitud, los microgeles tienen un tamaño de partícula de >200 nm a 50 μ m, también con respecto al promedio estadístico, en que para la determinación del tamaño de partículas no esféricas se considera el mayor diámetro.

Los soportes particularmente preferidos para la presente invención son microgeles con un tamaño de partícula (promedio estadístico determinado según se describe anteriormente) de 1 μ m a 10 μ m. Tales microgeles particularmente preferidos son fácilmente manejables en su preparación y proporcionan suficiente capacidad para las sustancias activas del sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la invención.

Los microgeles tienen propiedades específicas debido a su estructura porosa abierta y sus cadenas poliméricas solvatadas en agua que pueden reaccionar a estímulos externos (tales como temperatura, pH o luz). Los microgeles sensibles al pH tienen grupos ácidos o básicos en sus cadenas poliméricas. Dependiendo del pH, estos grupos se protonan/desprotonan reversiblemente, lo que conduce a cambios de volumen del gel. Esta función permite la liberación controlada por el pH de iones o moléculas del gel.

Básicamente, los sistemas de liberación de microgeles clásicos son cápsulas. Otros sistemas de liberación son, por ejemplo, vesículas, coloidosomas o cubosomas.

Se prefiere un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la presente invención, en el que el péptido de anclaje se une a la hoja, tronco, tallo, raíz, fruto, en particular las semillas, yema, flor y/o tubérculo de una planta. En este contexto, se prefiere que el péptido de anclaje se una a una de estas partes de la planta al menos el 10 %, preferentemente el 20 % y de manera particularmente preferente el 30 % más fuertemente que a otras partes de la planta. En este contexto, "unirse más fuertemente" significa que en la prueba de eliminación por lavado según el ejemplo 1 se lava menos sustancia activa de la parte diana de la planta que de otras partes de la planta, según los porcentajes indicados.

Se prefiere un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la presente invención, en el que la función de soporte es un nano o microgel y está configurada de tal modo que la sustancia activa permanece en el soporte o se libera directamente, con un retraso temporal o dependiendo de una estimulación. Se prefiere particularmente una liberación con retraso temporal y/o dependiente de estimulación.

Con respecto a la aplicación de nano o microgeles, tal como se indica anteriormente, el estado de la técnica es diseñar estos geles de tal manera que puedan reaccionar a ciertos estímulos. Los estímulos preferidos a los que pueden reaccionar los micro o nanogeles son parámetros abióticos tales como pH, temperatura, humedad, luz (incluida la luz UV), duración de la irradiación, pulsos eléctricos o pulsos magnéticos, y factores bióticos tales como inductores, reacciones enzimáticas, patrones moleculares asociados a microorganismos, patrones moleculares asociados a patógenos, patrones moleculares asociados a lesiones y patrones moleculares asociados a herbívoros.

Se prefiere un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la presente invención, en el que el sistema es una proteína de fusión.

En el caso de una proteína de fusión, el péptido de anclaje, la función de soporte y preferentemente también la sustancia activa constarían respectivamente de péptidos. Tal como se indica anteriormente, en la técnica anterior se conocen una serie de (poli)péptidos que tienen, por ejemplo, propiedades antimicrobianas. Una proteína de fusión semejante tiene la ventaja de que puede producirse industrialmente con facilidad y, en particular, puede tener un efecto que no perjudica al medio ambiente.

Se da preferencia a un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la presente invención, en particular, en forma de una proteína de fusión, en el que la función de soporte es una cadena de 2 a 100 aminoácidos, preferentemente de 5 a 50 aminoácidos, que están diseñados como espaciadores.

Parte de la presente invención es también el uso de un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la presente invención para la inmovilización de una sustancia activa para proteger la planta y/o promover el crecimiento de la planta.

En el contexto de la presente invención, la inmovilización ha de entenderse como una unión a la planta en el sentido de la definición descrita anteriormente.

Parte de la presente invención es también un procedimiento para proteger las plantas y/o promover el crecimiento de las plantas que comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la presente invención y
- b) aplicar el sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal sobre una planta.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Prueba de eliminación por lavado

La prueba de eliminación por lavado se usa para probar si el péptido de anclaje proporciona una mejor unión del sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la invención según la presente invención:

1. Se proporcionan el sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal que ha de probarse (muestra) y moléculas de la misma composición, pero sin que esté presente la sección del péptido de anclaje (ejemplo comparativo).

2. Procedimiento

- a) Se lleva a cabo una incubación durante cinco minutos a temperatura ambiente sobre la parte de la planta que ha de probarse con la muestra y la muestra comparativa.
- b) Seguidamente, se lava tres veces con tampón de Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, durante cinco minutos cada vez.
- c) Seguidamente, se determina la concentración de la muestra y de la muestra comparativa sobre la parte respectiva de la planta mediante un procedimiento de detección adecuado.

Una mejor unión dentro del significado de la presente invención se da al menos cuando permanece sobre la planta

Ejemplo 3

Protocolo general para la expresión de un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la invención en forma de una proteína de fusión.

5

Principio: expresión de proteínas de fusión en pequeñas cantidades.

El gen que codifica el sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la invención, incluido el péptido de anclaje, se introduce en el vector de expresión pET28. La cepa de expresión es *E. coli* Bi21-Gold.

10

Procedimiento:

1. Sembrar *E. coli* en una placa de agar. Dejar crecer durante la noche a 37 °C.
- 15 2. Tomar una colonia individual de la placa para inocular un precultivo de 10 ml de medio LBKan e incubar durante la noche a 37 °C y 200 rpm.
3. Preparar 10 ml de medio TB (80 ml de disolución A + 20 ml de disolución B) por cepa y añadir kanamicina.
4. Determinar la DO₆₀₀ del precultivo; inocular el cultivo principal con x ml del precultivo, $x = 2,5/DO_{\text{precultivo}}$.
5. Determinar la DO₆₀₀ del cultivo principal (objetivo: al menos 0,025).
- 20 6. Inocular el cultivo principal a 37 °C, 200 rpm, durante 4 horas.
7. Añadir 100 µl de IPTG 0,1 M.
8. Incubar el cultivo principal a 16 °C, 200 rpm, durante 48 horas.
9. Recolectar las células por centrifugación, 30 min a 4 °C, 4.000 rpm (centrifuga Eppendorf 5810 R).
10. Las células pueden almacenarse a -20 °C hasta su uso.

25

Las sustancias químicas se obtienen de Sigma Aldrich.

Las disoluciones usadas son, en detalle:

- 30 Medio LB: triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), NaCl (10 g/l).

El medio LB se trata en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

- 35 Por 100 ml de medio LB del precultivo (LBKan), se añadieron 100 µl de sulfato de kanamicina (100 mg/ml en ddH₂O) estéril por filtración.

Medio TB:

Disolución A:

40

12 g de peptona, 24 g de extracto de levadura, 4 g de glicerol, volumen completado hasta 800 ml con dH₂O y tratamiento en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Disolución B:

45

K₂HPO₄ (12,5 g) y KH₂PO₄ (2,31 g), el volumen se completó hasta 200 ml con dH₂O y se aplicó un tratamiento en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

- 50 Para la preparación del medio TB con kanamicina (TBkan), se añadieron 100 µl de sulfato de kanamicina (100 mg/ml en ddH₂O) estéril por filtración a 200 ml de medio TB.

Ejemplo 4 - Purificación de proteínas de fusión

Mediante la cromatografía de afinidad, las proteínas se separan sobre la base de una interacción reversible entre una proteína y un ligando específico unido a una matriz cromatográfica. Esta técnica proporciona gran selectividad, alta resolución y normalmente una gran capacidad para la proteína de interés. La técnica puede usarse para separar biomoléculas activas de formas desnaturalizadas o funcionalmente alteradas o para aislar sustancias puras que están presentes a baja concentración en grandes volúmenes de muestras sin tratar o para eliminar impurezas específicas.

60

Procedimiento:

1. Un sedimento de células (por ejemplo, del ejemplo 3) se resuspende con el tampón A (véase más adelante), que se ha mezclado con PMSF 0,1 mM y DTT 0,1 mM, justo antes de su uso. Se usan 6 ml/g de células.
- 5 2. La desintegración de las células se lleva a cabo en un homogeneizador de alta presión, 3 veces a 150 MPa.
3. Seguidamente, se centrifuga durante 15 min a 4 °C y 4.000 rpm.
4. Después se realiza una centrifugación durante 30 min a 4 °C y 10.000 rpm (centrífuga Sorvall). Si el sobrenadante no es transparente, se centrifuga de nuevo durante 15 min en las mismas condiciones.
5. Seguidamente, el sobrenadante se filtra con filtros de membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm (no estériles)
- 10 (VWR).
6. Después se realiza una purificación mediante una etiqueta His-tag en un sistema ÄKTA Prime con una columna NiNTA (5 ml).
7. Equilibrado de la columna:
- 15 - la columna se lava 5 veces con ddH₂O
- el tubo B se llena con el tampón B (véase más adelante)
- el tubo A se llena con el tampón A y después se lava en la columna con 2 volúmenes de lecho del tampón A (0 % de tampón B)
- 20 8. Aplicación del sobrenadante transparente:
- se ajusta una tasa de flujo de 2 ml/min a una presión máxima de 0,6 MPa
- la columna se equilibra con el tampón A
- el gradiente inicial es de 100 ml, 0-50 % de tampón B
- 25 - los eluidos se recogen en fracciones de 2-5 ml
- las fracciones se analizan mediante SDS-Page
- se dializa frente al tampón C a 4 °C durante 24 horas
- la pureza se determina mediante SDS-Page y la concentración se determina con un ensayo BCA
- se añade una disolución con PMSF 0,1 mM, DTT 0,1 mM y EDTA
- 30 - opcionalmente, la disolución se congela a -20 °C
- y opcionalmente, a continuación se liofiliza
- la proteína de fusión liofilizada puede almacenarse a -20 °C

Nota: Las sustancias químicas proceden de Sigma Aldrich y se usó un sistema ÄKTA Prime.

35

Disoluciones:

Tampón A (tampón de Tris 50 mM, imidazol 5 mM, pH 8,0): 4,44 g/l de Tris HCl, 2,65 g/l de Tris base y 0,34 g/l de imidazol se diluyen con dH₂O.

40

Tampón B (tampón de Tris 50 mM, imidazol 500 mM, pH 8,0): 4,44 g/l de Tris HCl, 2,65 g/l de Tris base y 34,04 g/l de imidazol se mezclan en dH₂O.

Tampón C (tampón de Tris 50 mM, pH 8,0): 4,44 g/l de Tris HCl y 2,65 g/l de Tris base se diluyen con dH₂O.

45

Ejemplo 5

Modelo para un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la invención:

- 50 En este modelo, para mejorar la detectabilidad, la sustancia activa (por ejemplo, un péptido antimicrobiano) se sustituye por eGFP.

La figura 1 muestra esquemáticamente la cadena polipeptídica de una proteína de fusión según la invención.

- 55 El sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la invención consta de una etiqueta His-tag para la purificación (opcional), una parte de la proteína verde fluorescente (eGFP) como modelo de la sustancia activa y para la fácil detección de la función de soporte en forma de un espaciador de 10x alanina con un sitio de corte opcional para una proteasa (TEV) (10xAla-TEV), así como el péptido de anclaje, cecropina A (CecA) o LCI.

60

Las secuencias aminoacídicas correspondientes son las siguientes:

SEQ 50: His-eGFP-10xAla-TEV-CecA

5 MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSKEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGD
 ATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQE
 RTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADK
 QKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRD
 10 HMLLEFVTAAGITLGMDELYKAAAAAAAAAAENLYFQGKWKLFKKIEKVGQNIIRDGIKA
 GPAVAWGQATQIAK

SEQ 51: His-eGFP-10xAla-TEV-LCI

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSKEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGD
 15 ATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQE
 RTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADK
 QKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRD
 HMLLEFVTAAGITLGMDELYKAAAAAAAAAAENLYFGAIKLVQSPNGNFAASFVLDGT
 20 KWIFKSKYYDSSKGYWVGIVVWDRK

La secuencia **SEQ 52**, MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH, representa la etiqueta His-tag.

La secuencia **SEQ 53**, MVSKEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTT
 GKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKT
 25 RAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRH
 NIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGI
 TLGMDELYK, representa eGFP.

La secuencia **SEQ 54**, AAAAAAAAAA, representa el espaciador de alanina y la secuencia **SEQ 55**, ENLYFQG,
 30 representa el sitio de corte para TEV. El resto de la secuencia es la secuencia de CecA o la secuencia de LCI
 (véase el ejemplo 2).

Ejemplo 6

35 Ejemplo de aplicación de la proteína de fusión modelo:

La secuencia de ADN de la proteína de fusión modelo se insertó en el vector de expresión pET28 y se expresó
 según el ejemplo 3. Después de obtener y purificar las proteínas de fusión (véase el ejemplo 4), se aplicaron a
 40 hojas de soja.

La proteína de fusión según SEQ 51 (LCI-eGFP) se usó como muestra en una concentración de 1 mg/ml y la
 misma secuencia sin la secuencia del péptido de anclaje, también expresada según el ejemplo 3, se usó como
 muestra comparativa. La muestra comparativa también se aplicó en una concentración de 1 mg/ml.

45 La incubación se llevó a cabo según la prueba de eliminación por lavado, véase el ejemplo 1. Después de
 llevar a cabo la prueba de eliminación por lavado según el ejemplo 1, solo en la hoja de soja tratada con la
 muestra (proteína de fusión modelo) se observó una gran cantidad de señales fluorescentes con el
 microscopio de fluorescencia, mientras que la fluorescencia dejó de ser detectable en la hoja tratada con la
 muestra comparativa.

Ejemplo 7

Ejemplo de secuencias de péptidos de anclaje de unión con variantes de la secuencia de LCI:

55 **SEQ 56** (LCI, tipo silvestre)

AIKLVQSPNGNFAASFVLDGTKWIFKSKYYDSSKGYWVGIVVWDRK

SEQ 57 (LCI KR1)

AIKLVQSLNGNFAARFVLDGTKWIFKCKYYDSSKGYWVGIYEVWGRK

5

SEQ 58 (LCI KR2)

AIRLVQSQKCNFAASFVLGGTKWTFKGGKYYDSSKDYWVGIYEVVRK

10 **SEQ 59** (LCI KR3)

AIKQVQSPNGNFAASFVLDGTKWIFKSKYYDSSRGYWVGIYVWDRK

SEQ 60 (LCI KR4)

15

AIKLVHSPNGNFAASFVLDGTKWIFKSKFYDSSKGYWVGTYEVARK

REIVINDICACIONES

1. Sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal, que comprende al menos un péptido de anclaje para una mayor unión a un órgano de una planta o una parte de una planta, una función de soporte que está unida directa o indirectamente al péptido de anclaje y una sustancia activa para proteger la planta y/o promover el crecimiento y/o el rendimiento de la planta, en el que la sustancia activa está unida física o químicamente a la función de soporte.
2. Sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la reivindicación 1, en el que el péptido de anclaje consta de 2 a 300 aminoácidos.
3. Sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la reivindicación 1 o 2, en el que la sustancia activa se selecciona del grupo que consta de
- 15 - pesticida, en particular acaricida, ovicida, insecticida, molusquicida, nematocida, rodenticida y/o avicida,
 - herbicida, en particular alguicida, gramínicida y/o arboricida,
 - bactericida,
 - fungicida,
 - fitoprotector,
 - 20 - organismos beneficiosos, en particular bacterias beneficiosas y hongos beneficiosos que colonizan las raíces de las plantas y/o crecen en la rizosfera,
 - medios para promover el crecimiento vegetal y/o la colonización de organismos beneficiosos,
 - y
 - agentes de crecimiento vegetal, en particular nutrientes u hormonas.
4. Sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la función de soporte se selecciona del grupo que consta de nanogel, microgel, polisoma, polimerosoma, sintosoma, espaciador poliaminoácido, coloidosoma y cubosoma.
5. Sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el péptido de anclaje se une a una hoja, tronco, tallo, raíz, fruto, en particular semillas, yema, flor y/o tubérculo de una planta.
6. Sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la función de soporte es un nano o microgel y está configurada de tal modo que la sustancia activa permanece en el soporte o se libera directamente, con un retraso temporal y/o dependiendo de una estimulación.
7. Sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la reivindicación 6, en el que el estímulo se selecciona del grupo que consta de los parámetros abióticos pH, temperatura, humedad, luz (incluida la luz UV), duración de la irradiación, pulsos eléctricos y pulsos magnéticos, y factores bióticos tales como inductores, reacciones enzimáticas, patrones moleculares asociados a microorganismos, patrones moleculares asociados a patógenos, patrones moleculares asociados a lesiones y patrones moleculares asociados a herbívoros.
8. Sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sistema es una proteína de fusión.
9. Sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según la reivindicación 8, en el que la función de soporte es un espaciador de 2-100 aminoácidos.
10. Uso de un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la inmovilización de una sustancia activa para proteger la planta y/o promover el crecimiento de la planta.
11. Procedimiento para proteger las plantas y/o promover el crecimiento de las plantas que comprende las etapas siguientes:
- a) proporcionar un sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y
 - b) aplicar el sistema de protección vegetal y/o promoción del crecimiento vegetal a una planta.

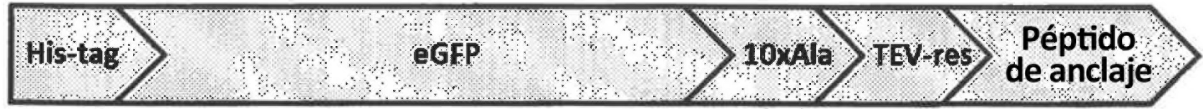


Figura 1