

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 016**

21 Número de solicitud: 201830609

51 Int. Cl.:

**A01N 63/04** (2006.01)

**C07K 14/385** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**21.06.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**23.12.2019**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTIFICAS (80.0%)  
C/ SERRANO 117  
28006 MADRID ES y  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
AGRIGENÓMICA (20.0%)**

72 Inventor/es:

**MANZANARES MIR, Paloma;  
GARRIGUES CUBELLS, Sandra;  
MARCOS LOPEZ, Jose Francisco y  
COCA LOPEZ, Maria**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Métodos para el control biológico de infecciones producidas por fitopatógenos en plantas y cultivos**

57 Resumen:

Métodos para el control biológico de infecciones producidas por fitopatógenos en plantas y cultivos. La presente invención se refiere al uso de una proteína de origen fúngico denominada AfpA y/o a composiciones que comprenden dicha proteína, en el control de agentes fitopatógenos, preferentemente hongos fitopatógenos y oomycetes de plantas y/o cultivos.

ES 2 736 016 A1

## DESCRIPCIÓN

### **Métodos para el control biológico de infecciones producidas por fitopatógenos en plantas y cultivos**

5

La presente invención se engloba en el sector agroalimentario, preferiblemente en la protección de plantas y cultivos frente a fitopatógenos. Específicamente se refiere al uso de una proteína de origen fúngico denominada AfpA y/o de composiciones que comprenden dicha proteína, en control biológico de fitopatógenos en plantas y/o

10

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

15

Los fitopatógenos representan una gran amenaza para la agricultura, la seguridad alimentaria y la salud pública. Los agentes patógenos más comunes en las plantas son los hongos, que también engloban al grupo de oomycetos, aunque las bacterias, y los nemátodos también son importantes. Las enfermedades causadas por micoplasmas y virus no se registran a menudo, al ser difíciles de detectar. Así por ejemplo, las infecciones causadas por hongos destruyen cada año más de 125 millones de toneladas de los principales cultivos, incluyendo arroz, trigo, maíz, patata y soja, cantidades que servirían para alimentar a más de 600 millones de personas. Además, muchos de estos hongos fitopatógenos son productores de micotoxinas, contaminando muchos productos alimentarios con estos compuestos dañinos para la salud animal y humana (Bebber, D.P. y Gurr, S.J. Fungal Genet. Biol., 2015; 74: 62–64). La situación es cada vez más alarmante ante el cambio climático y la globalización que promueven la aparición de nuevas cepas fúngicas más agresivas y la invasión de nuevos territorios. El control de hongos fitopatógenos depende exclusivamente de unos pocos fungicidas, que no son 100% efectivos debido al desarrollo de resistencias por la gran plasticidad de los genomas fúngicos, y porque la legislación es cada vez más restrictiva para productos fitosanitarios debido a los efectos indeseados en la cadena alimenticia (Montesinos, E., FEMS Microbiol. Lett., 2007; 270: 1–11; Perfect, J.R., Expert Opin. Emerg. Drugs., 2016; 21: 129–131).

20

25

30

35

En la actualidad, el uso de biocidas químicos es el principal método empleado para proteger los cultivos frente a las infecciones causadas por fitopatógenos. Sin embargo,

la aplicación de estos compuestos químicos en la agricultura presenta serias desventajas, como son su actividad inespecífica frente a otros microorganismos no perjudiciales, la aparición de cepas resistentes o sus efectos negativos para el medioambiente o la salud humana, que pueden abarcar desde simples irritaciones cutáneas hasta daños en el sistema reproductivo y posible carcinogenicidad. Estos problemas han impulsado el estudio y la búsqueda de nuevas alternativas para el control de las enfermedades causadas por fitopatógenos, que presenten una mayor especificidad y escasos o nulos efectos para la salud de los consumidores, agricultores y para el medio ambiente sin que afecten a la calidad final de los productos.

10

Las proteínas antifúngicas (*Anti-Fungal Proteins*, AFPs) secretadas por hongos filamentosos son consideradas como candidatas prometedoras para el desarrollo de nuevas moléculas y terapias antifúngicas. Las AFPs son proteínas pequeñas, catiónicas, muy estables, ricas en cisteínas (*Cysteine-Rich Proteins*, CRPs) y con una estructura compacta en láminas  $\beta$  estabilizada por la formación de hasta cuatro puentes disulfuro. Las AFPs son producidas y secretadas en grandes cantidades al medio de cultivo por hongos filamentosos ascomicetos, y exhiben una alta actividad antifúngica en el rango micromolar, y son inócuas frente a células bacterianas, animales o vegetales. La primera AFP identificada fue la producida por *Aspergillus giganteus* (AgAFP) (Nakaya, K., et al. Eur. J. Biochem., 1990; 193: 31-38). Otra proteína bien caracterizada es la proteína PAF de *Penicillium chrysogenum*, que se secreta y produce en grandes cantidades en el medio de cultivo (hasta 80 mg/L) (Marx, F., et al., Gene, 1995; 167: 167-171).

25

Ambas proteínas, AgAFP y PAF, inhiben el crecimiento de hongos filamentosos, incluyendo patógenos humanos y vegetales, sin afectar a levaduras, bacterias y células vegetales o de mamíferos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Moreno, A.B., et al., Appl. Microbiol. Biotech. 2006, 72: 883-895; Hegedüs, N. y Marx, F. Fungal Biol. Rev. 2013, 26: 132-145). También destaca como proteína candidata para el control de hongos patógenos la proteína AfpB procedente del hongo *Penicillium digitatum*, cuya potencia antifúngica es incluso mayor, frente a diferentes hongos fitopatógenos, que la actividad antifúngica de la proteína PAF (Garrigues, S., et al., Sci Rep., 2017; 7: 14663).

35

En el genoma de hongos filamentosos se encuentran entre 1 y 3 genes que codifican

proteínas con homología de secuencia con AFPs, y que han sido anotadas como “antifungal proteins” (Garrigues, S., et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016; 100: 2243). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos no se han podido ni detectar, ni identificar, ni producir las correspondientes proteínas antifúngicas. Sigue existiendo, en el estado de la técnica, la necesidad de producir de forma efectiva nuevas y más potentes AFPs para combatir infecciones de fitopatógenos, en plantas y/o cultivos

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una solución a la demanda existente de nuevos compuestos naturales útiles para el control biológico de fitopatógenos en plantas y/o cultivos.

En este sentido, la presente invención se refiere al uso de una proteína de origen fúngico que presenta actividad antifúngica y contra oomycetes frente a infecciones en plantas y/o cultivos. Dicha proteína antifúngica pertenece a la familia de proteínas denominadas AFPs, específicamente se denomina AfpA, de aquí en adelante proteína de la invención, y comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, la proteína AfpA comprende la SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente aún, la proteína AfpA consiste en la SEQ ID NO: 1. El hongo productor de la proteína de la invención pertenece al género *Penicillium*, preferiblemente a la especie *P. expansum*, y más preferiblemente aún, es la cepa *P. expansum* CECT 20906.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende dicha proteína AfpA de la invención (de aquí en adelante composición de la invención), donde opcionalmente, dicha composición puede comprender además excipientes, aditivos y/u otros principios activos adicionales, para el control biológico de fitopatógenos en plantas y/o cultivos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para el control biológico de fitopatógenos en plantas y/o cultivos que comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína de la invención, o de una composición que comprenda la proteína de la invención, a dichas plantas, cultivos y/o al medio que les rodea.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**FIG. 1. Producción y purificación de la proteína AfpA que comprende la SEQ ID NO: 1 a partir del sobrenadante del cultivo de *P. expansum* CECT 20906 crecido en Medio Mínimo (MM).** Se muestran fotografías del análisis en contenido de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y tinción con azul Coomasie. **(A)** Contenido en proteínas del sobrenadante de cultivos de *P. expansum* CECT 20906 crecido en medio rico en nutrientes (PDB) o en medio mínimo (MM) durante 5, 7, y 10 días de cultivo (5d, 7d y 10d, respectivamente). **(B)** Contenido en proteínas de preparaciones puras de la proteína PAF de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 2) y de la proteína AfpA de *P. expansum* (SEQ ID NO: 1) junto con un marcador de proteínas de tamaño conocido como control. La proteína AfpA está identificada en los geles con un triángulo negro y la proteína PAF con un triángulo blanco.

**FIG. 2. La proteína AfpA que comprende la SEQ ID NO: 1 de la invención protege plantas de tomate de la infección por *Botrytis cinerea*.** En la figura se muestran imágenes de hojas de plantas de tomate inoculadas con una suspensión de conidios procedentes de *B. cinerea* ( $0.5 \times 10^6$  conidios/ml) conjuntamente con distintas concentraciones (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) de las proteínas AfpA, AfpB y PAF. Las fotos fueron tomadas 4 días después de la inoculación.

**FIG. 3. La proteína AfpA que comprende la SEQ ID NO: 1 reduce significativamente el tamaño de la lesión causada por *B. cinerea* en hojas de plantas de tomate.** Cuantificación del área lesionada a los 4 días de inoculación mediante análisis de imágenes con el programa Fiji Imagej (<https://imagej.net/ImageJ>). Los datos corresponden al valor medio del porcentaje de hoja lesionada de al menos 3 hojas por tratamiento. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas (Tukey test \*  $p < 0.005$ ; \*\*  $p < 0.001$ ).

**FIG. 4. La proteína AfpA que comprende la SEQ ID NO: 1 mantiene la protección de las plantas de tomate a la infección por *B. cinerea* a largo plazo.** Imágenes de hojas de tomate inoculadas con una suspensión de conidios *B. cinerea* ( $0.5 \times 10^6$  conidios/ml) conjuntamente con distintas concentraciones de las proteínas indicadas. Las fotos fueron tomadas 7 días después de la inoculación.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Un primer aspecto de la presente invención se refiere el uso de la proteína AfpA de la invención o de la composición que la comprende para el control biológico de  
5 fitopatógenos en plantas y/o cultivos, donde preferiblemente los fitopatógenos son hongos y/o oomycetes.

La proteína AfpA utilizada en la presente invención pertenece a la familia de proteínas AFPs, es secretada por el hongo *Penicillium expansum*, preferiblemente por la cepa *P. expansum*  
10 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 20906.

En el contexto de la presente invención, el término "proteína AfpA" se define por una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1, más preferiblemente  
15 consiste en la SEQ ID NO: 1. El término "secuencia codificante de AfpA" se define como una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína AfpA de SEQ ID NO:1, y que puede comprender diversas variantes procedentes de: a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1, b) moléculas de ácido  
20 nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a), c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético, d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 85%, un 90%, un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, un 95%, un 96%, un  
25 97%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1; en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína AfpA. Incluye, por tanto, diversas variantes de la proteína AfpA, esto es, proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

30 En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una proteína sustancialmente homologa a la proteína AfpA. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación. Dichas  
35

variantes son además funcionalmente equivalentes a la proteína AfpA de la invención.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga a la proteína AfpA" cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la  
5 secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferiblemente de, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, y más preferiblemente de, al menos, un 99%. El término  
10 "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias aminoacídicas que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias, que incluye, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1999; 215: 403-410).

El término "fragmento", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de la proteína AfpA o de una de sus variantes.

20 La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que la proteína o el fragmento de la proteína en cuestión mantiene esencialmente las propiedades relativas al control biológico de fitopatógenos descritas en este documento. Dichas propiedades se pueden determinar mediante métodos  
25 convencionales tales como los descritos en los ejemplos que acompañan a esta descripción.

La proteína AfpA de la invención puede obtenerse mediante el cultivo de hongo *P. expansum* en condiciones particulares. Así, un método preferido para la obtención de  
30 la proteína de la invención comprende las siguientes etapas:

- (a) Cultivar un hongo de la especie *Penicillium expansum* en medio mínimo de cultivo bajo condiciones que permiten el crecimiento del hongo,
- (b) Recoger el sobrenadante del cultivo de la etapa (a),
- (c) Purificar la proteína de la invención del sobrenadante de la etapa (b).

35

*P. expansum*, preferiblemente la cepa CECT 20906 se cultiva en medio de cultivo mínimo bajo condiciones que permiten el crecimiento de dicho hongo. Dicho medio de cultivo mínimo comprende los nutrientes y requerimientos necesarios para el desarrollo y crecimiento del hongo. Preferiblemente, el medio de cultivo mínimo  
5 comprende 2% sacarosa, 0,3 % NaNO<sub>3</sub>, 0,05 % MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,005 % FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,1 % elementos traza solución A, 25 mM tampón fosfato potásico, pH 5.8. Los elementos traza de la solución A son preferiblemente: 0,1% FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,9% ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,4% CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O, 0,01% MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,01% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,01% Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O.

10

En dicho medio de cultivo se inocula una suspensión de conidios de *P. expansum* CECT 20906, preferiblemente igual o superior a 5x10<sup>4</sup> conidios/mL de cultivo, por ejemplo, de 5x10<sup>6</sup> conidios/ml de cultivo.

15

Las condiciones para el cultivo y crecimiento de *P. expansum* CECT 20906 son las condiciones convencionales, conocidas por los expertos en la materia, para el desarrollo y crecimiento de dichos hongos, y comprenden, por ejemplo, la incubación del medio de cultivo, previamente inoculado, en un agitador orbital con agitación, a una temperatura comprendida entre 26 y 28 °C durante un periodo de tiempo comprendido  
20 entre 24 y 96 horas. En el Ejemplo 1 se describen unas condiciones y unos medios de cultivo apropiados para el desarrollo y crecimiento de *P. expansum* CECT 20906.

20

Para la obtención de la proteína de la invención, se cultiva el hongo *P. expansum* en medio mínimo durante al menos 5 días, preferiblemente durante al menos 7 días, más  
25 preferiblemente durante al menos 10 días. Transcurrido dicho tiempo, se procede a la separación del micelio del medio de cultivo y a la recuperación del sobrenadante (etapa (b)). El micelio puede retirarse por cualquier método apropiado de separación sólido-líquido, por ejemplo, mediante decantación, filtración, centrifugación, etc.; no obstante, en una realización particular, la retirada del micelio se realiza por  
30 centrifugación. El sobrenadante recogido se somete a un proceso de diálisis en tampón fosfato sódico 20 mM pH 6,6.

30

La purificación de la etapa (c) se realiza mediante técnicas cromatográficas o de ultrafiltración.

35



Alternativamente, la proteína AfpA de la presente invención también puede ser sintetizada por medio de cualquier técnica conocida en el estado de la técnica. La técnica de síntesis puede ser, pero sin limitarse a, una técnica de síntesis macromolecular, como por ejemplo, pero sin limitarse a, síntesis de péptidos en fase  
5 sólida. También se puede obtener cualquiera de los péptidos de la invención mediante técnicas de ADN recombinante, es decir, mediante técnicas adaptadas de biología molecular y biotecnológica, en microorganismos o plantas modificados genéticamente, o mediante expresión transitoria.

10 La proteína AfpA de la invención puede combinarse o mezclarse con otros productos que faciliten su vehiculación (en su caso) y/o que estabilicen y/o potencien su efecto, tales como otros principios activos, preferiblemente otros compuestos para el control biológico de fitopatógenos. Dichas combinaciones dan lugar a la composición de la invención, que comprende la proteína AfpA y que se usa en el control biológico de  
15 fitopatógenos de plantas y/o cultivos.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término control biológico se refiere al control de un agente, organismo o microorganismo patógeno de plantas y/o cultivos, es decir un fitopatógeno, mediante el empleo de productos de origen biológico, preferiblemente  
20 AFPs, más preferiblemente la proteína AFP de la invención, o de una composición que comprenda dicha proteína de la invención, siendo capaces de controlar dichos agentes, organismos o microorganismos patógenos de plantas y/o cultivos y que pueden ser aplicados directa o indirectamente a la planta, cultivo, y/o al medio que les rodea.

25 A efectos de la presente invención, el término vehículo aceptable se refiere a una sustancia o combinación de sustancias que puede(n) ser utilizada(s) en el sector agrícola o alimentario, e incluye, por ejemplo, adyuvantes, sólidos o líquidos, diluyentes, disolventes, tensioactivos, etc. Dichos compuestos permiten una mejor  
30 aplicación de la proteína de la invención y/o alternativamente de los principios activos que la acompañan en las composiciones de la invención. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse mediante procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

35 Adicionalmente, las composiciones de la invención, pueden comprender, además, un

excipiente, un diluyente, un adyuvante y/o un estabilizante, aceptables. Como entiende el experto en la materia, la proteína de la invención estará presente en la composición de la invención en una cantidad agrícolamente eficaz, es decir, en una cantidad tal que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, impedir, retardar o retrasar la

5 progresión de estadios de enfermedades causadas por fitopatógenos en plantas y/o cultivos. Dichos compuestos permiten una mejor aplicación de la proteína de la invención y/o alternativamente de los principios activos que la acompañan en las composiciones de la invención, especialmente a plantas y/o cultivos tratadas según la invención.

10

La composición de la invención también puede contener, si se desea, uno o más productos y/o principios activos que estabilicen y/o potencien su efecto. Alternativamente, dichos productos pueden ser una o más proteínas con diferentes actividades enzimáticas requeridas para la modificación o degradación de paredes

15 celulares del patógeno, tales como, una o más enzimas líticas capaces de modificar o degradar paredes celulares, por ejemplo, enzimas con actividad celulolítica, mananolítica, quitinolítica, proteolítica, etc. En otra realización particular, la composición de la invención comprende, además, uno o más compuestos químicos para el control biológico de fitopatógenos. Como compuesto químico puede utilizarse

20 cualquiera de los compuestos químicos utilizados habitualmente, preferentemente un compuesto químico seleccionado del grupo formado por los compuestos químicos para el control de fitopatógenos que afectan a la membrana, los que afectan a la síntesis de la pared celular y sus mezclas. Alternativamente, dichos principios activos se seleccionan de la lista que consiste en insecticidas, cebos, agentes esterilizantes,

25 bactericidas, acaricidas, nematocidas, sustancias reguladoras del crecimiento, herbicidas, protectores, fertilizantes, etc.

Tanto la proteína de la invención, como la composición de la invención pueden presentarse en cualquier forma de presentación apropiada para su transporte,

30 administración o aplicación, por ejemplo, en forma líquida o sólida, tal como en forma de un granulado o polvo. Las formas de presentación líquidas son adecuadas, por ejemplo, para su pulverización sobre las plantas y/o cultivos, así como sobre el medio que les rodea. Estas composiciones incluyen no solo composiciones que están listas para aplicarse mediante un dispositivo adecuado, tal como un dispositivo de

35 pulverización o espolvoreado, sino también composiciones comerciales concentradas,

que deben diluirse antes de aplicación a las plantas, cultivos, así como al medio que les rodea.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el control biológico de fitopatógenos de plantas y/o cultivos que comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína de la invención y/o de la composición de la invención, a dichas plantas y/o cultivos. En una realización preferida del método de la invención, este también comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína de la invención y/o de la composición de la invención al medio que rodea dichas plantas y/o cultivos.

10

A efectos de la presente invención, el término “cantidad eficaz” o “cantidad efectiva” se refiere a la cantidad necesaria para paliar, mejorar, estabilizar, impedir, retardar o retrasar la progresión de estadios de desarrollo del agente fitopatógeno en cuestión en la planta o cultivo y obtener, de este modo, unos resultados beneficiosos o deseados.

15

Una cantidad eficaz puede administrarse en una sola vez o en varias administraciones. En términos de tratamiento y protección, una cantidad eficaz es la cantidad suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, impedir, retardar o retrasar la progresión de estadios de enfermedades causadas por patógenos de plantas y/o cultivos.

20

La cantidad eficaz de la proteína AfpA de la invención, o de una composición que la comprenda, puede variar dentro de un intervalo de concentraciones, preferiblemente en el intervalo de 1 a 10  $\mu\text{M}$ . En otra realización más preferida aún, la concentración va a depender de cada especie o cultivo concreto, y un experto medio en la materia es capaz de determinar la concentración de dicho compuesto que se deberá administrar.

25

Las cantidades o dosis indicadas en la presente invención se dan como ejemplos ilustrativos del procedimiento según la invención. Un experto en la técnica sabrá cómo adaptar las dosis de aplicación, especialmente según la naturaleza de la planta y/o cultivo, así como el método de administración.

30

En el método de la invención, la proteína AfpA de la invención, y/o la composición que la comprende, se puede aplicar de forma preventiva a las plantas y/o cultivos, para evitar la aparición de las infecciones y enfermedades causadas por fitopatógenos que preferentemente se seleccionan entre hongos y/o oomycetes. El tratamiento preventivo tiene su base en que los péptidos de la invención inhiben el crecimiento de

35

fitopatógenos, preferentemente hongos y/o oomycetes patógenos de las plantas y/o

cultivos.

En el método de la invención, la proteína AfpA de la invención, y/o la composición que la comprende, se pueden emplear para tratar dichas infecciones y enfermedades una vez se ha detectado su presencia en las plantas y/o cultivos, ya que el péptido de la invención y la composición que lo comprende, inhiben el crecimiento de los fitopatógenos, preferentemente hongos y/o oomycetes fitopatógenos causantes de dichas infecciones y enfermedades.

En esta descripción el término infección se refiere a la invasión y destrucción de un órgano de la planta, por ejemplo, hojas, raíces, tallos, flores, semillas, etc., por parte de los microorganismos patógenos. Por tanto, se trata de un proceso localizado. En cambio, el término enfermedad se refiere a un proceso que afecta a la planta, dando lugar a síntomas.

La prevención y/o tratamiento de las plantas y/o cultivos con la proteína y/o composición de la invención se lleva a cabo mediante procedimientos convencionales, tales como administración directa sobre las partes aéreas de plantas y/o cultivos, sobre las raíces, o sobre el medio que les rodea. En una realización particular, la administración de la proteína y/o de la composición de la invención se lleva a cabo mediante, por ejemplo, pulverización, inmersión, vaporización, atomización, diseminación, espolvoreado, espumado, riego, etc.

A efectos de la presente invención, los agentes, organismos o microorganismos patógenos de plantas y/o cultivos, llamados también fitopatógenos, incluyen a cualquier agente, organismo o microorganismo capaz de producir daño o infección en dichas plantas y/o cultivos, por ejemplo, hongos, oomycetos, bacterias, virus, nematodos e insectos. En una realización más preferida, los agentes fitopatógenos patógenos son hongos y/o oomycetos, en otra realización más preferida, los fitopatógenos son hongos.

A efectos de la presente invención, los fitopatógenos se seleccionan de la lista que consiste en: *Botrytis spp.*, por ejemplo *Botrytis cinerea*; *Magnaporthe spp.*, por ejemplo *Magnaporthe oryzae*; *Fusarium spp.*, por ejemplo *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*; *Puccinia spp.*; por ejemplo *Puccinia graminis f. sp. tritici*, *Puccinia*

*striiformis* f. *sp. tritici*, *Puccinia triticina*; *Blumeria* spp., por ejemplo *Blumeria graminis*; *Mycosphaerella* spp., por ejemplo *Mycosphaerella graminicola*; *Erysiphe* spp., por ejemplo *Erysiphe cichoracearum*, *Erysiphe betae*, *Erysiphe necator*, *Erysiphe orontii*; *Colletotrichum* spp., por ejemplo *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum boninense*, *Colletotrichum trifolii*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum destructivum*, *Colletotrichum caudatum*, *Colletotrichum crassipes*, *Colletotrichum dematium*, *Colletotrichum kahawae*, *Colletotrichum orbiculare*, *Colletotrichum sublineolum*, *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum spinaceae*, *Colletotrichum lindemuthianum*; *Ustilago* spp., por ejemplo *Ustilago maydis*; *Melampsora* spp., por ejemplo *Melampsora lini*; *Phakopsora* spp., por ejemplo *Phakopsora pachyrhizi*; *Rhizoctonia* spp., por ejemplo *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* spp., por ejemplo, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora nicotinae*.

15

Entre las plantas y cultivos susceptibles de ser tratados con la proteína y/o con las composiciones de la invención se incluyen plantas utilizadas para la producción de energías renovables, para la nutrición humana o animal, para la producción maderera y plantas ornamentales.

20

Ejemplos de plantas y cultivos utilizados en la producción de combustibles o energías renovables incluyen, pero no están limitadas a (i) plantas utilizadas en la producción de energía eléctrica: obtenidas principalmente de cultivos energéticos de madera de crecimiento rápido, como el álamo, el sauce, eucaliptos, coníferas, acacias, plátanos, etc., y plantas herbáceas, tales como cardos, juncos, euforbias, nopales, etc.; y (ii) plantas utilizadas en la producción de biocombustibles: producción de bioalcoholes obtenidos de remolacha, maíz, sorgo dulce, caña de azúcar, topinambur, etc., y bioaceites obtenidos de colza, girasol, soja, etc. Ejemplos de plantas de madera incluyen, pero no se limitan a, pinos, eucaliptos, alcornoques, cedro, roble, encina, etc.

30

Ejemplos ilustrativos no limitativos de plantas ornamentales de interés incluyen plantas que pertenecen a los géneros *Aeschynantus*; *Canna*; *Columnea*; *Anemone*; *Azalea*; *Begonia*; *Calceolaria*; *Camelia*; *Dianthus*; *Freessia*; *Gerbera*; *Hibiscus*; *Hypoestes*; *Kalanchoe*; *Nicotiana*; *Pelargonium*; *Petunia*; *Príkmula*; *Rannunculus*; *Rhipsalidopsis*; *Rosa*; *Saintpaulia*; *Sinningia-gloxinia*; *Streptocarpus*; *Tigridia*; *Verbena*; y *Zinnia*. Otras

35

plantas ornamentales incluyen orquídeas (*Orchidaceae*) y arbustos ornamentales, que

incluyen laurel bayo (*Laurus nobilis*), madreselva (*Lonicera fragrantissima*), magnolia estrella (*Magnolia stellata*), hortensia (*Hydrangea macrophylla*), Laburnum (*Laburnum watereri*), rosa japonesa o kerria (*Kerria japonica*), etc.

5 Ejemplos ilustrativos no limitantes de plantas utilizadas en la nutrición humana o animal incluyen árboles frutales, que incluyen, pero no se limitan a, cerezo, ciruelo, melocotonero, albaricoquero, olivo, mango, peral, manzano, níspero, membrillo, naranjo, limonero, higuera, papaya, castaño, roble, encina, coscoja, avellano, almendro, nogal, etc.; plantas forrajeras, que incluyen pero no se limitan a  
10 leguminosas (por ejemplo, tréboles, alfalfas, clitorias, arachis, leucaena, campanillas, judías, lentejas, garbanzos y guisantes, etc.), pastos (por ejemplo, pasto de centeno, festuca, pasto de huerta, grama azul, pasto de rhodes, hierba búfalo, andropogones, brachiarias, pasto Bermuda y hierba elefante, merkeron, caña de azúcar, hierba de Taiwán y hierba de maíz, etc.), granos (por ejemplo, sorgo, trigo, centeno, cebada ,  
15 maíz, avena, etc.); plantas para consumo humano (lechuga, repollo, espinacas, acelgas, judías verdes, plantas de tomate, col, sandía, melón, pepino, calabacín, berenjena, pimiento, fresa, brócoli, coliflor, ajo, cebolla y zanahoria, manzano, peral, albaricoquero, cerezo, melocotonero, ciruelo, platanera, aguacate, frambueso, kiwi, vid olivar etc.), etc. Esta lista no es limitativa sino ilustrativa de plantas y cultivos  
20 potencialmente susceptibles de ser tratados con la proteína y composición de la invención.

Por tanto, la proteína AfpA de la invención constituye una alternativa real al uso de  
25 pesticidas de origen químico, los cuales tienen alta capacidad contaminante y efectos nocivos sobre la salud, ya que la utilización de biopesticidas basados en la capacidad natural de organismos vivos conlleva menores riesgos para el medio ambiente y la salud de los consumidores. Además, tal y como se observa en los ejemplos incluidos en el presente documento, la proteína AfpA de la invención es una proteína  
30 extremadamente activa frente a fitopatógenos de plantas y/o cultivos, respecto de otras proteínas de tipo AFP anteriormente conocidas, mejorando sustancialmente los resultados conocidos hasta la fecha respecto del uso de otras proteínas para el control biológico de fitopatógenos conocidas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus  
35 variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o

pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

10

### Materiales y Métodos

#### Microorganismos

Los microorganismos empleados en los ensayos antimicrobianos incluyen: *Botrytis cinerea* CECT 2100. Para obtener los conidios, el hongo se cultivó en medio sólido PDA (*potato dextrose agar*) durante 7-10 días a 25 °C para posteriormente obtener las suspensiones de conidios necesarias para los ensayos.

15

#### Producción y purificación de la proteína AfpA de la invención.

Para la producción de la proteína AfpA de la presente invención, la cepa parental de *P. expansum* CECT 20906 se creció en 200 mL de Medio Mínimo para *P. chrysogenum* (2% sacarosa, 0,3 % NaNO<sub>3</sub>, 0,05 % MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,005 % FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,1 % elementos traza solución A, 25 mM tampón fosfato potásico, pH 5.8; Elementos traza solución A: 0,1% FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,9% ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,4% CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 0,01% MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,01% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,01% Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O) durante 10 días, utilizando un inóculo inicial de 5,5 x 10<sup>5</sup> conidios/mL.

20

25

Tras eliminar los restos de micelio por centrifugación (10000 rpm, 30 min), el sobrenadante se dializó (Snake Skin Dialysis Tubing 3.5 k MWCO) frente a tampón fosfato sódico 20 mM pH 6.6. Posteriormente se llevó a cabo una cromatografía líquida en un sistema AKTA Purifier (GE Healthcare) utilizando una columna de intercambio catiónico (ReSourceS 6 mL; GE Healthcare) equilibrada en el tampón de diálisis. Las proteínas no adsorbidas se eluyeron en el mismo tampón fosfato, y las proteínas adsorbidas a la resina cromatográfica se eluyeron mediante un gradiente lineal de NaCl (0-0,5 M) en tampón fosfato 20 mM pH 6.6. Las fracciones cromatográficas (6

30

35

mL) se evaluaron mediante SDS-PAGE 16 % y las fracciones conteniendo la proteína AfpA de la invención se mezclaron, para a continuación, ser dializadas frente a agua bidestilada y liofilizadas y posteriormente ser utilizadas en los ensayos antimicrobianos.

5

La concentración de la proteína AfpA de la invención se determinó utilizando el coeficiente de extinción  $\epsilon_{280} = 0,639$  determinado experimentalmente.

La masa molecular y huella peptídica de la proteína AfpA de la invención se determinó en el Servicio de Proteómica de la Universitat de València.

10

**Ejemplo 1.** Producción y purificación de la proteína AfpA (SEQ ID NO: 1) a partir del sobrenadante del cultivo de *P. expansum* CECT 20906 crecido en Medio Mínimo.

*P. expansum* CECT 20906 secreta la proteína AfpA (SEQ ID NO: 1) al sobrenadante de cultivo tras 5 días de crecimiento en Medio Mínimo (**FIG. 1**). Es de destacar que cuando *P. expansum* CECT 20906 se cultiva en medio rico PDB no se detecta la proteína AfpA (SEQ ID NO: 1) en el sobrenadante del cultivo (**FIG. 1A**). Estos datos demuestran que la producción y obtención de la proteína AfpA en el sobrenadante de cultivos, solo es posible cuando el hongo *P. expansum* CECT 20906 se cultiva en Medio Mínimo.

20

La producción óptima de la proteína AfpA se alcanza entre los 7-10 días de crecimiento. Como se ha descrito en materiales y métodos, la purificación de la proteína se lleva a cabo en un único paso cromatográfico de intercambio catiónico, obteniéndose unos rendimientos de producción de entre 100 a 150 mg/L.

25

La identidad y la secuencia de aminoácidos de la proteína AfpA fue confirmada mediante análisis por huella peptídica, confirmándose que la secuencia aminoacídica de la proteína AfpA de la presente invención (SEQ ID NO: 1) es diferente a la secuencia aminoacídica de otras proteínas AFPs previamente conocidas, como por ejemplo, la proteína antifúngica AFP procedente de *Aspergillus giganteus*, la proteína PAF de *P. chrysogenum* y la proteína AfpB de *P. digitatum*.

30

35



**Ejemplo 2.** Actividad antifúngica de la proteína AfpA de la invención frente a infección provocada por *B. cinerea* en hojas de plantas de tomate.

Los ensayos se realizaron sobre hojas de tomate mediterráneo (*Solanum lycopersici*, cultivar Marmande) de plantas de 21 días crecidas a 22°C con 16 h de día. Las hojas se inocularon colocando dos gotas (20 µl cada una) en dos puntos diferentes en el haz de la hoja con una suspensión de  $0.5 \times 10^6$  conidios/ml, conjuntamente con la proteína AfpA a distintas concentraciones (1, 5, 10 µM). Además de un control con agua estéril (control positivo de la infección) y un control sin hongo (control negativo de la infección), se incluyeron las proteínas antifúngicas PAF (SEQ ID NO: 2) procedente del hongo *P. chrysogenum* y la proteína AfpB (SEQ ID NO: 3) procedente del hongo *P. digitatum*.

El desarrollo de las lesiones se siguió visualmente durante 7 días. A los 4 días de inoculación, y antes de que las lesiones adyacentes se unan en el control sin proteína, se cuantificó el área de la hoja lesionada mediante procesamiento de imágenes.

En la **FIG. 2** se muestra el aspecto de las hojas a los 4 días después de la inoculación, en la **FIG. 3** la cuantificación del área lesionada, y en la **FIG. 4** el aspecto de las hojas a los 7 días después de la inoculación. Estos resultados muestran una clara capacidad de inhibición de la infección dependiente de la concentración de la proteína AfpA de la invención, claramente superior a la observada con la proteína AfpB y con la proteína PAF. La eficacia de la protección de las hojas de la planta de tomate infectadas con *B. cinerea* y en presencia de la proteína AfpA de la invención, se mantiene con el tiempo hasta los 7 días después de la inoculación, mientras que el caso de la proteína AfpB la protección solo perdura en el tiempo cuando las concentraciones utilizadas de la misma son muy altas.

Es conocido que *B. cinerea* es un patógeno de amplio espectro de acción que infecta a más de 200 especies vegetales causando la podredumbre gris y provocando importantes pérdidas económicas a nivel global (superiores a 1 billón de € al año). Es considerado un típico necrótrofo que provoca la muerte del tejido del cual se alimenta. Su control se realiza principalmente con fungicidas químicos suponiendo un coste de más de 40 €/ha año, y más de 540 millones de € en el mercado de los fungicidas (estimaciones 2002). El control casi total de la infección por *B. cinerea* en plantas de

tomate mediado por la proteína AfpA de la invención a concentraciones de trabajo tan bajas como 1  $\mu\text{M}$  demuestra su uso en protección vegetal y representa una estrategia aplicable a muchas especies vegetales huéspedes de *B. cinerea*, así como de otros patógenos fúngicos de plantas y cultivos.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una proteína que comprende la SEQ ID NO: 1, o de una composición que comprende la SEQ ID NO: 1, para el control biológico de fitopatógenos en plantas y/o cultivos.
2. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde el fitopatógeno se seleccionan de la lista que consiste en: *Botrytis spp.*, *Magnaporthe spp.*, *Fusarium spp.*, *Puccinia spp.*; *Blumeria spp.*, *Mycosphaerella spp.*, *Erysiphe spp.*, *Colletotrichum spp.*, *Ustilago spp.*, *Melampsora spp.*, *Phakopsora spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Phytophthora spp.*, y/o cualquier combinación de los mismos.
3. Uso según la reivindicación 2 donde el fitopatógeno se selecciona de la lista que consiste en: *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Puccinia graminis f. sp. tritici*, *Puccinia striiformis f. sp. tritici*, *Puccinia triticina*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminicola*; *Erysiphe cichoracearum*, *Erysiphe betae*, *Erysiphe necator*, *Erysiphe orontii*; *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum boninense*, *Colletotrichum trifolii*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum destructivum*, *Colletotrichum caudatum*, *Colletotrichum crassipes*, *Colletotrichum dematium*, *Colletotrichum kahawae*, *Colletotrichum orbiculare*, *Colletotrichum sublineolum*, *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum spinaceae*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Ustilago maydis*, *Melampsora lini*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora nicotinae*, y/o cualquier combinación de los mismos.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde las plantas y/o cultivos se seleccionan de la lista que consiste en: árboles frutales, seleccionados de la lista que consiste en cerezo, ciruelo, melocotonero, albaricoquero, olivo, mango, peral, manzano, níspero, membrillo, naranjo, limonero, higuera, papaya, castaño, roble, encina, coscoja, avellano, almendro, nogal; plantas forrajeras, seleccionadas de la lista que consiste en: tréboles, alfalfas, clitorias, arachis, leucaena, campanillas, judías, lentejas, garbanzos, guisantes; pastos seleccionados de la lista que consiste en: pasto de centeno, festuca, pasto de huerta, grama azul, pasto de rhodes, hierba búfalo, andropogones, brachiarias, pasto Bermuda, hierba elefante,

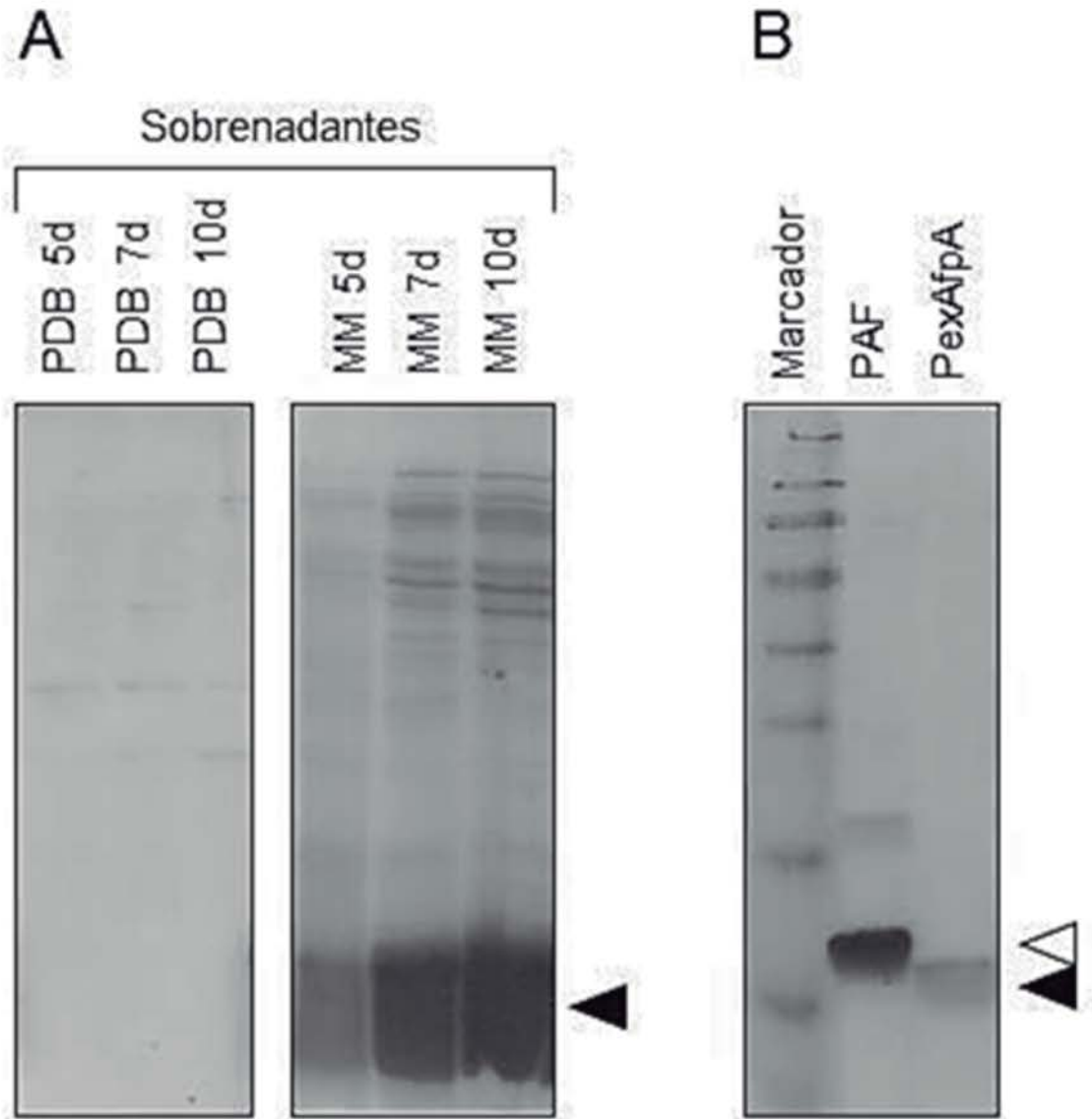
merkeron, caña de azúcar, hierba de Taiwán, hierba de maíz; cultivos de granos que se seleccionan de la lista que consiste en: sorgo, trigo, centeno, cebada, maíz, avena; plantas para consumo humano seleccionadas de la lista que consiste en: lechuga, repollo, espinacas, acelgas, judías verdes, plantas de tomate, col, sandía, melón, pepino, calabacín, berenjena, pimiento, fresa, brócoli, coliflor, ajo, cebolla, zanahoria, manzano, peral, albaricoquero, cerezo, melocotonero, ciruelo, platanera, aguacate, frambueso, kiwi, vid, olivar; plantas ornamentales que se seleccionan de los géneros *Aeschynantus*; *Canna*; *Columnea*; *Anemone*; *Azalea*; *Begonia*; *Calceolaria*; *Camelia*; *Dianthus*; *Freessia*; *Gerbera*; *Hibiscus*; *Hypoestes*; *Kalanchoe*; *Nicotiana*; *Pelargonium*; *Petunia*; *Príkmula*; *Rannunculus*; *Rhipsalidopsis*; *Rosa*; *Saintpaulia*; *Sinningia-gloxinia*; *Streptocarpus*; *Tigridia*; *Verbena*; y *Zinnia*.

5. Método para el control biológico de fitopatógenos en plantas y/o cultivos que comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína que comprende la SEQ ID NO: 1, o de una composición que comprenda la SEQ ID NO: 1, a dichas plantas y/o cultivos.
6. Método según la reivindicación 5 donde la SEQ ID NO: 1, o la composición que la comprende, se administra vía radicular, foliar y/o en el agua de riego.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 donde la SEQ ID NO: 1, o la composición que la comprende, se administra mediante inyección, inmersión, vaporización, pulverización, diseminación, riego, espolvoreado y/o espumado.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 donde la cantidad eficaz de la SEQ ID NO: 1, o de la composición que la comprende varía de entre 1 a 10  $\mu$ M.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 donde el fitopatógeno se seleccionan de la lista que consiste en: *Botrytis spp.*, *Magnaporthe spp.*, *Fusarium spp.*, *Puccinia spp.*; *Blumeria spp.*, *Mycosphaerella spp.*, *Erysiphe spp.*, *Colletotrichum spp.*, *Ustilago spp.*, *Melampsora spp.*, *Phakopsora spp.*, *Rhizoctonia spp.* *Phytophthora spp.* y/o cualquier combinación de los mismos.
10. Método según la reivindicación 9 donde el fitopatógeno se selecciona de la lista que consiste en: *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium*

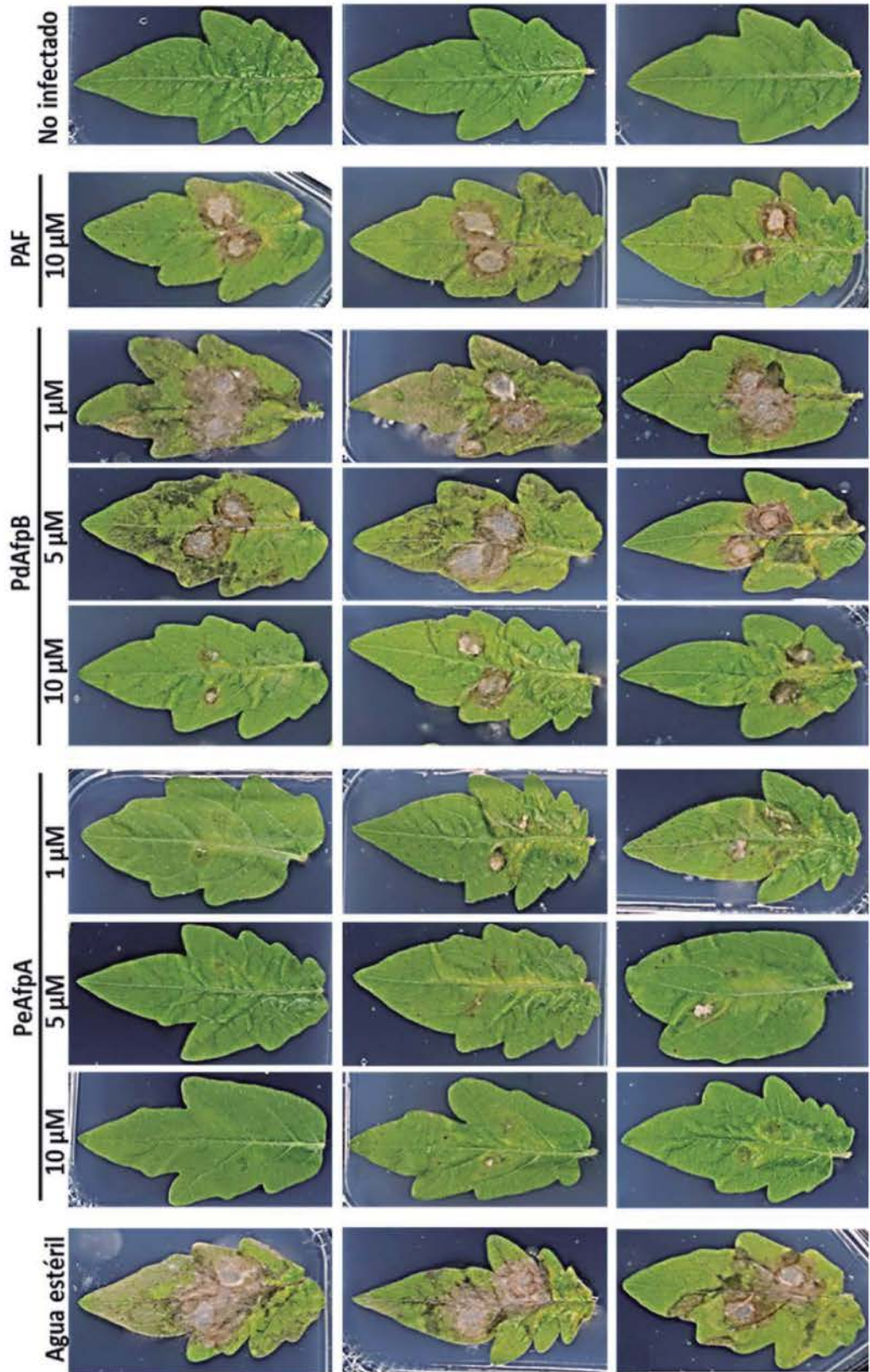
5 *graminearum*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *Puccinia triticina*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminicola*; *Erysiphe cichoracearum*, *Erysiphe betae*, *Erysiphe necator*, *Erysiphe orontii* *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum graminicola*,  
 5 *Ustilago maydis*, *Melampsora lini*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora nicotinae*, y/o cualquier combinación de los mismos.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 donde las plantas y/o  
 10 cultivos se seleccionan de la lista que consiste en: árboles frutales, seleccionados de la lista que consiste en cerezo, ciruelo, melocotonero, albaricoquero, olivo, mango, peral, manzano, níspero, membrillo, naranjo, limonero, higuera, papaya, castaño, roble, encina, coscoja, avellano, almendro, nogal; plantas forrajeras, seleccionadas de la lista que consiste en: tréboles, alfalfas, clitorias, arachis,  
 15 leucaena, campanillas, judías, lentejas, garbanzos, guisantes; pastos seleccionados de la lista que consiste en: pasto de centeno, festuca, pasto de huerta, grama azul, pasto de rhodes, hierba búfalo, andropogones, brachiarias, pasto Bermuda, hierba elefante, merkeron, caña de azúcar, hierba de Taiwán, hierba de maíz; cultivos de granos que se seleccionan de la lista que consiste en: sorgo, trigo, centeno,  
 20 cebada, maíz, avena; plantas para consumo humano seleccionadas de la lista que consiste en: lechuga, repollo, espinacas, acelgas, judías verdes, plantas de tomate, col, sandía, melón, pepino, calabacín, berenjena, pimiento, fresa, brócoli, coliflor, ajo, cebolla, zanahoria, manzano, peral, albaricoquero, cerezo, melocotonero, ciruelo, platanera, aguacate, frambueso, kiwi, vid, olivar; plantas ornamentales que  
 25 se seleccionan de los géneros *Aeschynantus*; *Canna*; *Columnea*; *Anemone*; *Azalea*; *Begonia*; *Calceolaria*; *Camelia*; *Dianthus*; *Freessia*; *Gerbera*; *Hibiscus*; *Hypoestes*; *Kalanchoe*; *Nicotiana*; *Pelargonium*; *Petunia*; *Príkmula*; *Rannunculus*; *Rhypsaliopsis*; *Rosa*; *Saintpaulia*; *Sinningia-gloxinia*; *Streptocarpus*; *Tigridia*; *Verbena*; *Zinnia*.

30



**FIG. 1**



**FIG. 2**

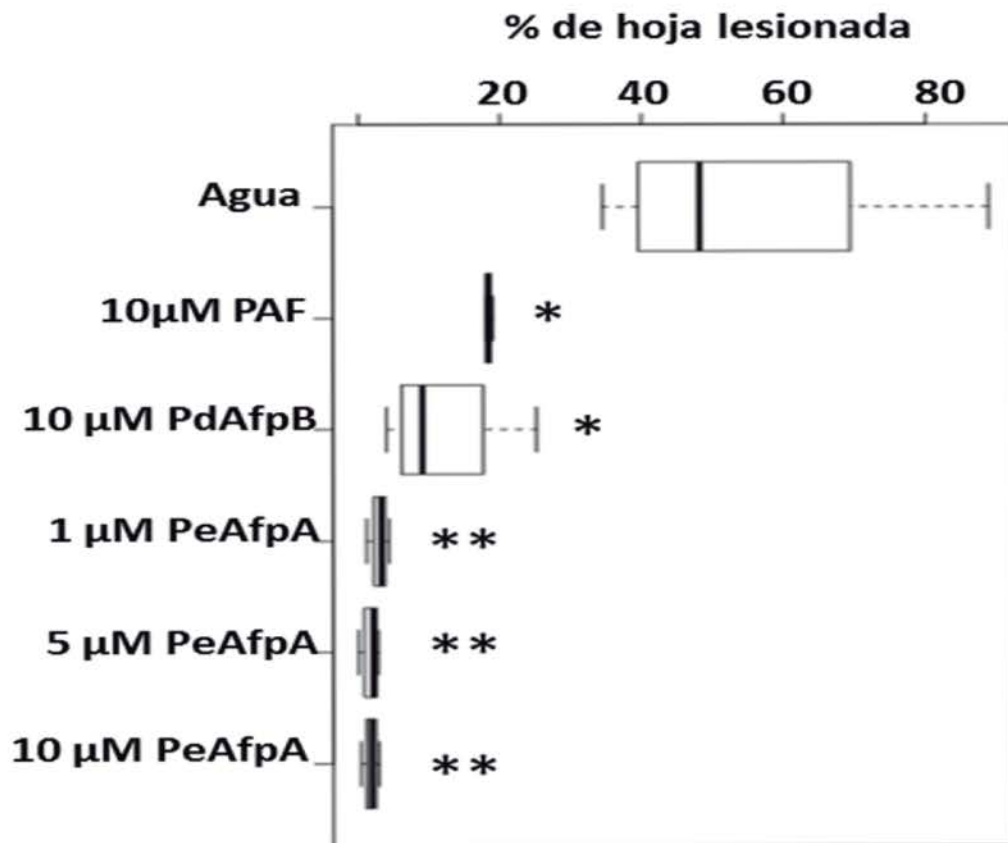


FIG. 3



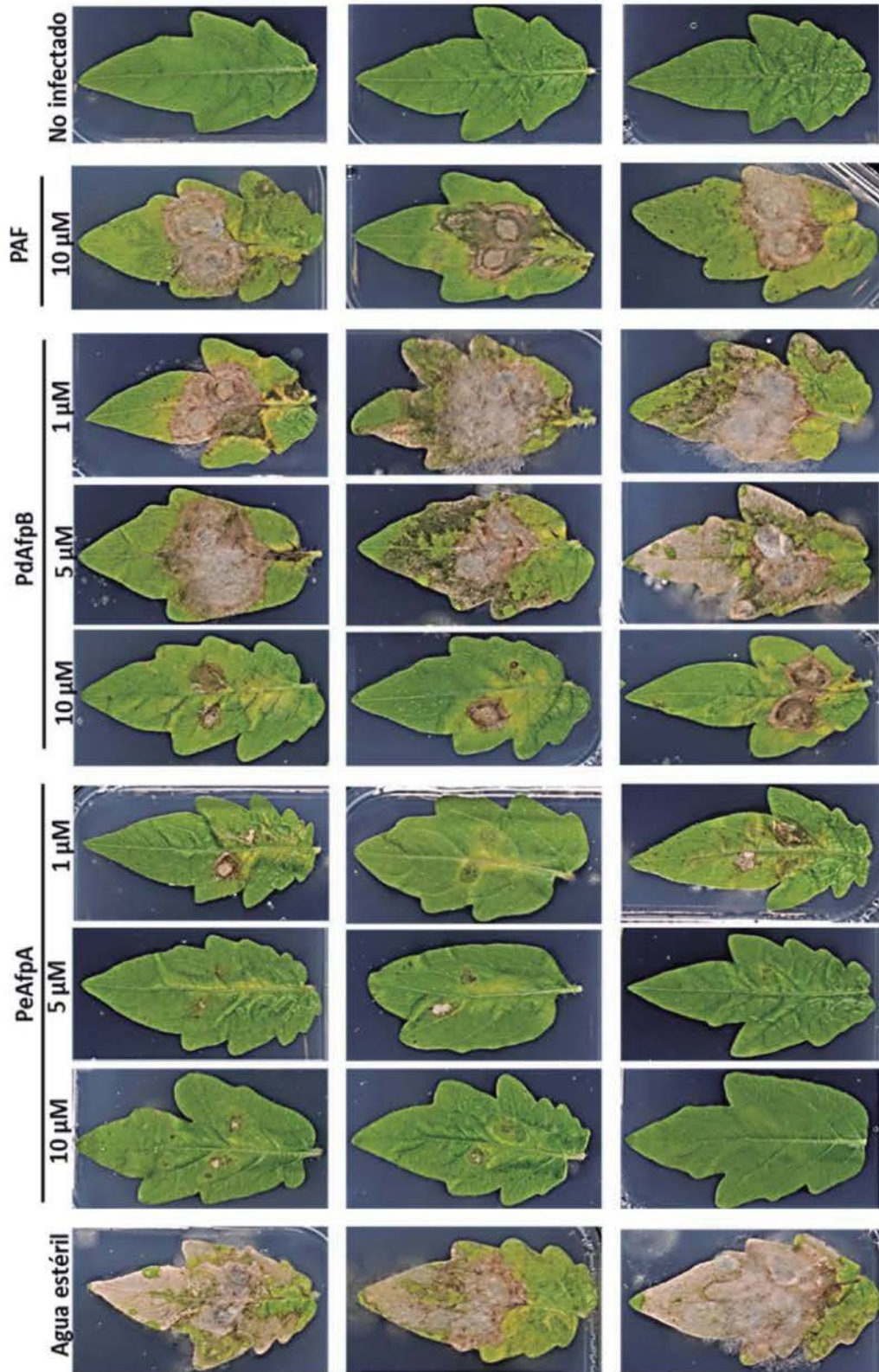


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201830609

22 Fecha de presentación de la solicitud: 21.06.2018

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **A01N63/04** (2006.01)  
C07K14/385 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	"Antifungal protein. <i>Penicillium expansum</i> ". 04/02/2015 [en línea][recuperado el 27/09/2018]. Recuperado de Internet <URL: <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0A2K8K6">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0A2K8K6</a> >. UniProtKB, n.º de acceso A0A0A2K8K6. Recuperado de la base de datos EMBL-EBI, Hinxton, Reino Unido, todo el documento.	1-11
X	GARRIGUES, S. et al. "Ocurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen <i>Penicillium digitatum</i> ". APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. , 01/03/2016, Vol. 100, N.º 5, páginas 2243-2256, <DOI: 10.1007/s00253-015-7110-3>; todo el documento, especialmente página 2247, Fig. 1.	1-11
X	BALLESTER, A.R. et al. "Genome, transcriptome, and functional analyses of <i>Penicillium expansum</i> provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity". MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, 01/03/2015, Vol. 28, N.º 3, páginas 232-248, <DOI: 10.1094/MPMI-09-14-0261-FI>; todo el documento, especialmente Materiales y Métodos.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
02.10.2018

Examinador  
M. Novoa Sanjurjo

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, HCAPLUS, EMBL-EBI, INTERNET