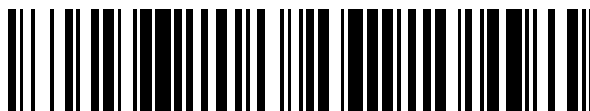


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 878 428**

51 Int. Cl.:

C07K 14/37

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2015 PCT/NL2015/050115**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15126256**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2015 E 15708905 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 3107395**

54 Título: **Proteína bioactiva, uso de la misma y método para su producción**

30 Prioridad:

21.02.2014 EP 14156146

10.12.2014 EP 14197253

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

18.11.2021

73 Titular/es:

KOPPERT B.V. (100.0%)

Veilingweg 14

2651 BE Berkel en Rodenrijs, NL

72 Inventor/es:

LORITO, MATTEO;

RUOCCO, MICHELINA;

VINALE, FRANCESCO y

WOO, SHERIDAN LOIS

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 878 428 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

Proteína bioactiva, uso de la misma y método para su producción

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la agronomía. Más en particular, la invención se refiere a la estimulación y promoción del crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas mediante el uso de ciertos péptidos bioactivos solos y/o en combinación con fitoestimulantes. De acuerdo con ciertos aspectos de la invención, la promoción del crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas está mediada por la facilitación de la interacción entre la planta y las especies de hongos estimulantes de la planta, tales como *Trichoderma spp.*

Estado de la técnica

- 15 Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* son cada vez más objeto de estudio, tanto por su relevancia como antagonistas de patógenos como por su interacción activa y positiva con las plantas colonizadas. Gracias a estas características beneficiosas, se desarrollan y comercializan bioplaguicidas y biofertilizantes que utilizan *Trichoderma spp.* como ingrediente activo (Harman *et al.*, 2010, Plant Disease 94:928-939).
- 20 La actividad antagónica de *Trichoderma* se basa principalmente en el micoparasitismo (Lorito *et al.*, 1993, Phytopathology, 83:313-318; Lorito *et al.*, 1996, Molecular Plant-Microbe Interactions, 9:206-213; Sanz *et al.*, 2004, Current Genetics, 46: 277-286; Zeilinger *et al.*, 1999, Fungal Genetics and Biology, 26:131-140), antibiosis (Schirmböck *et al.*, 1994, Applied and Environmental Microbiology, 60:4364-4370; Vinale *et al.*, 2008, Physiological and Molecular Plant Pathology, 72: 80-86, Vinale *et al.*, 2009, Letters in Applied Microbiology, 48, 705-711) y competencia por nutrientes y nichos ecológicos (Vargas *et al.*, 2009, Plant Physiology, 151: 792-808). Los mecanismos que regulan estos procesos son bien conocidos y ampliamente estudiados. Sin embargo, la información más reciente sugiere que, en muchos casos, el micoparasitismo y la antibiosis no son los mecanismos primarios y únicos de biocontrol. En los últimos años, el estudio sobre la inducción de la resistencia sistémica de las plantas (ISR, por sus siglas en inglés) por *Trichoderma spp.* durante el proceso de biocontrol tuvo una importancia creciente y, por lo tanto, ha sido profundamente explorado (Yedidia *et al.*, 1999, Applied and Environmental Microbiology, 65:1061-70; Woo *et al.*, 2006, Phytopathology, 96:181-185; Shores *et al.*, 2010, Phytopathology, 95:76-84; Harman *et al.*, 2004, Nature Review Microbiology, 2: 43-56). Estudios recientes documentaron que algunas cepas de *Trichoderma* pueden activar la ISR (Hanson y Howell 2004, Phytopathology, 94:171-176; Mandal y Mitra, 2007, Physiological and Molecular Plant Pathology, 71: 201-209; Segarra *et al.* 2007, Proteomics, 7:3943-3952), un mecanismo desencadenado por la colonización de raíces por rizobacterias u hongos no patógenos y regulado por una cascada de transducción de señales específica (Pieterse *et al.*, 1996, Plant Cell, 8:1225-1237; Segarra, *et al.*, 2009, Plant Biology, 11:90-96). Además, las plantas cuyas raíces son colonizadas por aislados seleccionados de *Trichoderma* están "sensibilizadas" y responden más rápido y/o más intensamente al ataque de patógenos, siguiendo un mecanismo conocido como cebado (Ahn, *et al.*, 2007, Molecular Plant Pathogen Interaction, 20:759-768; Conrath *et al.*, 2006, Plant Signalling and Behavior, 1:179-184).

Más en general, se produce una amplia comunicación entre plantas y los microbios durante las primeras etapas de su asociación, en la que las moléculas de señalización juegan un papel crucial. Desafortunadamente, los actores del cruce molecular entre *Trichoderma spp.* y las plantas, que han sido plenamente caracterizados desde ahora con su papel determinado de manera concluyente, todavía son pocos (Mukerjee *et al.*, 2013, Trichoderma Biology and Application, Stylus Pub Llc, Londres, Reino Unido, 327, pág.)

Con el fin de investigar si alguna molécula de señalización interesante relevante para la comunicación planta-microbio podría aislarse de *Trichoderma spp.*, los inventores de la presente invención llevaron a cabo experimentos en los que se investigó la presencia de proteínas de patrones moleculares asociados microbianos (MAMP, por sus siglas en inglés) producidos por *Trichoderma spp.* seleccionados durante su interacción con el material vegetal. En lugar de seleccionar las especies de *Trichoderma* *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. virens*, aplicadas con mayor frecuencia en biopesticidas y biofertilizantes, los inventores de la presente invención investigaron una cepa recién aislada de *T. longibrachiatum* (*T. longibrachiatum* cepa MK1 (KV966), en lo sucesivo también indicada como MK1 o KV966. Las cepas de *T. longibrachiatum* en el campo en general no se consideran buenos agentes de control biológico candidatos. Esto se debe, entre otras cosas, a su dinámica de crecimiento desfavorable, pero también por su capacidad, no encontrada en la mayoría de las demás especies de *Trichoderma*, para crecer a 37 °C. Por lo tanto, han sido mucho menos investigadas, desde un punto de vista molecular, para fines de aplicación de biocontrol.

De las incubaciones de *T. longibrachiatum* MK1, se seleccionó una proteína de aproximadamente 7 KDa para análisis adicional. Esta proteína resultó ser una proteína de hidrofobia de tipo II y, por lo tanto, se denominó HYTL01. Experimentos posteriores revelaron características sorprendentes de esta proteína de *Trichoderma longibrachiatum*, incluida la modulación del crecimiento de las plantas, incluida la mejora del peso fresco de la planta, la mejora del peso seco de la planta, la mejora del desarrollo radicular, incluida la mejora de la nodulación radicular en Leguminosae,

el aumento del porcentaje de germinación y aumento de la velocidad de germinación, el control de enfermedades y/o de patógenos y la inducción de resistencia sistémica. Las proteínas autólogas de especies de *Trichoderma*, en particular *T. longibrachiatum*, que tienen tales características no se ha descrito en la técnica anterior.

5 Sumario de la invención

Por tanto, la presente invención según un primer aspecto se refiere al uso de una fuente de una proteína que tiene al menos un 90 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, para la mejora de la nodulación radicular en el tratamiento de una planta seleccionada de Leguminosae. En este uso, la fuente de la proteína se selecciona de la biomasa de una cepa de *Trichoderma longibrachiatum* que comprende un gen autólogo que codifica la proteína o de un producto que comprende la proteína que proviene de dicha biomasa en la que la proteína se expresa como una proteína autóloga. El porcentaje de similitud de secuencia es la suma del porcentaje de identidad de secuencia más el porcentaje de cambios conservativos, en donde un cambio de aminoácido es un cambio conservativo si se selecciona de una de las sustituciones mencionadas en la tabla "Sustituciones conservativas de aminoácidos" presentada más adelante en la presente descripción de la invención. De acuerdo con ciertas realizaciones en el uso, la fuente de la proteína puede combinarse con el uso de uno o más bioestimulantes vegetales seleccionados de (i) una especie de *Trichoderma* distinta de *Trichoderma longibrachiatum*, (ii) ácido hirciánico o un isómero biológicamente activo del mismo, tal como el ácido isohirciánico, (iii) 6-pentil- α -pirona o (iv) rizobios.

Otro aspecto de la invención se refiere a una semilla de una planta seleccionada de la Leguminosae tratada con una composición que comprende un vehículo y biomasa de una cepa de *Trichoderma longibrachiatum* que comprende un gen autólogo que codifica la proteína tal como se define anteriormente o un producto que comprende la proteína que proviene de dicha biomasa en donde la proteína se expresa como una proteína autóloga, en donde dicha semilla comprende en su superficie la biomasa o respectivamente el producto que comprende la proteína que proviene de dicha biomasa.

Otro aspecto más de la invención se refiere a un método para cultivar una serie de plantas seleccionadas de las Leguminosae en donde el número de plantas se proporciona como semillas de acuerdo con la invención y proporciona al número de semillas los nutrientes y las condiciones ambientales adecuadas para desarrollarse.

Descripción de las figuras

Fig.1: Expresión del gen Hyt1 de *Trichoderma longibrachiatum* en medio salino (SMS) + sacarosa al 1 % (peso/volumen) (carril 1), SMS + celulosa al 1 % (peso/volumen) (carril 2), SMS + quitina al 1 % (peso/volumen) (carril 3), SMS + extracto crudo de hojas de tomate al 1 % (p/vol) (carril 4), SMS + filtrado de cultivo de *Rhizoctonia solani* al 1 % (vol/vol) (carril 5), SMS + paredes celulares purificadas de *R. solani* al 1 % (peso/volumen) (carril 6). Figura 2: SDS-PAGE teñido con plata de HYTLO1 purificado (carril derecho) y marcadores moleculares (carril izquierdo) en kD.

Fig. 3: Actividad antifúngica de HYTLO1. La espora de los patógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria spp.* y del agente de biocontrol *Trichoderma harzianum* cepa MK1-KV966 se hizo germinar a 25 °C durante 24 horas en caldo de dextrosa de patata (PDB) que contenía 5 μ M de HYTLO1 y se comparó con las germinadas en PDB más el mismo disolvente que el control.

Fig. 4. Efecto antifúngico de HYTLO1 sobre el cultivo de *B. cinerea* comparado con hidrofobinas similares purificadas de *T. harzianum* cepa T22 y *T. harzianum* cepa M10. El protocolo de ensayo se describe en Lorito M. et al. 1994. Microbiology, Reino Unido, 140:623-629. Los números del lado izquierdo indican la concentración micromolar de HYTLO1 utilizada. T22 y M10 = hidrofobina de la cepa T22 y M10, respectivamente. La inhibición de la colonia de patógenos está indicada por la intensidad reducida del color oscuro en los pocillos en comparación con el control (C).

Fig. 5: Efecto de HYTLO1 purificado (5 μ M) inyectado en hojas de tomate después de 48 horas bajo luz UV. La fluorescencia se debe a la acumulación de compuestos relacionados con la respuesta de defensa de las plantas.

Fig. 6: Efecto de HYTLO1 purificado (0,15, 2,5, 5,0 mM) sobre la activación de las respuestas de defensa de la planta de tomate. Las hojas se inyectaron con 10 ml de la solución de proteína y se analizaron después de 24 y 48 horas para la producción de: (A) anión superóxido (ensayo XTT, mg de p.s. = miligramo de peso seco), (B) Actividad de SOD (U/mg de proteínas), (C) acumulación de peróxido ROOH (ensayo FOX1), (D) Actividad LOX, (E) acumulación de fitoalexina rishitina (g de p.f. = gramo de peso fresco de la hoja). Los valores son medias \pm E.E. Los métodos utilizados son los siguientes. Se recogieron tejidos de plantas liofilizados (10 mg) de hojas de tomate inyectadas con HYTLO1 y sin inyectar en diferentes puntos de tiempo después de la inoculación (de 6 a 48 h) y se homogeneizaron. Se detectó el anión superóxido midiendo la reducción de hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio (XTT) a formazán, de acuerdo con Sutherland, M. W., y B. A. Learmonth, 1997, Free Radical Research, 27:283-289, con modificaciones documentadas por Castoria, R., et al., 2003, Phytopathology, 93:564-572. La absorbancia a 490 nm se midió en un lector de microplaca. Los niveles de XTT se expresaron como valores medios de absorbancia mg-1 \pm errores estándar. Las actividades de SOD, a pH 7,8 y 10,0 (EC 1.15.1.1) y las enzimas LOX (EC 1.13.11.12) se cuantificaron según lo descrito por Reverberi M, et

al., 2005, Free Radical Research, 39:637-647. Los hidroperóxidos totales (ROOH) se detectaron mediante el ensayo espectrofotométrico FOX mediante el seguimiento de la oxidación de naranja de xilenol a 560 nm (oxidación de iones ferrosos naranja de xilenol: FOX-1) (Banerjee D, *et al.*, 2003, Clinica Chimica Acta, 337:147-152). La cuantificación de la fitoalexina rishitina se realizó tratando las muestras de hojas con cloruro de metileno (2 ml) en presencia de 100 mg de BHT. Los tubos se dejaron en una campana extractora durante 15/20 minutos y se agitaron ocasionalmente. Los extractos se filtraron sobre papel de filtro Whatmann 3MM y se secaron bajo flujo de nitrógeno. La rishitina se cuantificó mediante GC-MS tal como se describe en Fanelli *et al.*, 1992, Natural Toxins 1: 136-146. Fig. 7: Efecto de HYTLO1 purificado sobre la activación de las respuestas de defensa de la planta de tomate. Las hojas se inyectaron con HYTLO1 en las concentraciones indicadas y se analizaron después de 48 horas mediante PCR en tiempo real para la acumulación de proteínas PR (relacionadas con la patogenia) PR1, PR2 y ARN de PIN2 (para conocer los métodos, véase Tucci M., *et al.*, 2011, Molecular Plant Pathology, 12:341-354) Los valores indicaron el n.º de veces de aumento frente al control no tratado.

Fig. 8: Efecto de la aplicación de HYTLO1 purificado sobre la infección de hojas de tomate por el patógeno *B. cinerea*. Se aplicaron 10 µl de una solución de HYTLO1 a las hojas de tomate y 2 horas después se aplicaron 10 µl de una suspensión de 1×10^6 esporas de *B. cinerea*/ ml en el mismo lugar. Las medidas se tomaron 72 horas después de la inoculación. Las barras de desviación estándar se obtuvieron de al menos tres experimentos diferentes, con cinco repeticiones y un total de 15 hojas tratadas por tratamiento.

Fig. 9: Efecto de la aplicación de HYTLO1 purificado sobre la planta de tomate y el desarrollo de las raíces. Las raíces de tomate (izquierda) y los esquejes de tomate (derecha) se sumergieron en una solución de HYTLO1 de 0,018 µM.

Fig. 10: Efecto de HYTLO1 sobre el crecimiento de la planta de tomate en comparación con el tratamiento con *T. harzianum* cepa T22 o el producto comercial GERMON E (GE) basado en la auxina ácido 1-naftalenacético, comercializado por L. Gobbi, Italia. (A) Aumento del crecimiento de la raíz y el tallo de HYTLO1 frente al control del agua, GERMON E o T22, 10 días después del tratamiento. (B) Aumento del desarrollo de la raíz (tratamiento HYTLO1 a la izquierda, control sin tratar a la derecha), (C) Efecto de HYTLO1 sobre el tamaño de la planta en comparación con T22. (D) Efecto de HYTLO1 sobre el desarrollo de las raíces en comparación con el control del agua, T22, GERMON E (también en combinación con HYTLO1). HYTLO1 se aplicó a la concentración final en el suelo a 10^{-8} M.

Fig. 11: Efecto de HYTLO1 purificado en plantas de tomate, aplicado por maceración en las raíces o por aspersión sobre las hojas. Para el riego, se aplicaron 50 ml de una solución que contenía 0,072 µg/ml de HYTLO1 (0,01 µM) por cada maceta que contenía 1 litro de tierra y 2 plantas de tomate, para un total de 4 aplicaciones. Para aplicación foliar, se pulverizaron 20 ml de una solución que contenía 0,072 µg/ml (0,01 µM) de HYTLO1 por cada maceta que contenía 2 plantas de tomate para un total de 4 aplicaciones.

Fig. 12: Efecto de HYTLO1 purificado sobre el crecimiento de *Arabidopsis* (A), porcentaje de germinación de semillas de pepino (B) y desarrollo de plántulas de *Lotus japonicus* (C). A: Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (Columbia-0: Col-0) se sembraron en compost F2 de Levington más arena (JFC Munro, Devon; <http://www.jfcmonro.com>) y se enfriaron durante 2 días a 4 °C. Las plantas se cultivaron en condiciones de días cortos (10 h de luz) en una cámara de ambiente controlado, a 22 °C durante el día y 18 °C por la noche con el 60 % de humedad relativa durante 5-6 semanas antes del trasplante. Se empaparon diez ml de soluciones estériles de HYTLO1 cada dos días a concentraciones de 0,072 µg/ml (0,01 µM) durante un mes en cada maceta que contenía 100 ml de suelo y 1 planta de *Arabidopsis*. Se utilizaron plantas no tratadas como controles. B: Se colocaron semillas de pepino estériles en una caja magenta que contenía medio de sal de Murashige y Skoog (MS) de concentración media (ICN Biomedicals) que contenía 1 % de agar y 1,5 % de sacarosa, se ajustó a pH 5,7 y se vernalizó durante 2 días a 4 °C en ausencia de luz. Se añadió una solución estéril de HYTLO1 al sustrato a una concentración final de 10^{-8} M antes de la solidificación del agar. C: Se utilizó la misma concentración de HYTLO1 en el medio agarizado utilizado para la prueba de *L. japonicus*.

Fig. 13: Efecto de la expresión transgénica del gen *Hyt1* en tomate. Los esquejes forman rápidamente nuevas raíces en presencia de agua.

Fig. 14: Efecto de la expresión transgénica del gen *Hyt1* sobre la resistencia del tomate a *B. cinerea*. Las plantas se inocularon con 10 µl de una suspensión de 1×10^6 esporas de *B. cinerea*/ml y se midió la formación de área necrótica después de 24 (1 dti = día tras la inoculación) y 48 horas (2 dti). Los valores indican el tamaño del área necrótica (mm²).

Fig. 15: Efecto de la inactivación génica de *Hyt1* en la actividad de biocontrol *in vivo* de *T. longibrachiatum*. Se aplicaron la cepa de tipo silvestre (ts), 1 mutante de Δ Hyt1 (T3) representativo y un control transformado con vector vacío como recubrimiento de semillas. Los controles no tratados (T-) y las plantas de tomate tratadas con *Trichoderma* se infectaron con *B. cinerea* inoculando la tercera hoja verdadera con 10^6 L de una suspensión de 1×10^6 esporas del patógeno/ml. Las plantas inoculadas se envolvieron en bolsas de plástico transparente para lograr condiciones de alta humedad relativa y se incubaron en una cámara de cultivo a 18 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz. La propagación de la enfermedad se registró a 2 (2 dti), 3 (3dti) y 5 (5dti) días tras la infección, midiendo las lesiones necróticas con un calibre electrónico y calculando el área como una elipse. Los valores son medias con DT obtenidas de al menos tres experimentos diferentes con cinco repeticiones y un total de 15 plantas tratadas por tratamiento.

Fig. 16: Efectos de la inactivación del gen *Hyt1* sobre la actividad de promoción del crecimiento vegetal de *T. longibrachiatum* cepa MK1-KV966 (A, efecto sobre las raíces; B, efecto en toda la planta). Los tratamientos de

semillas de *Trichoderma* fueron: control sin tratar (T-), *T. longibrachiatum* de tipo silvestre (ts); mutantes de Hytlo1 □ (T1, T3, T4), control de vector vacío (Thph). Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos con cuatro repeticiones por tratamiento.

Fig. 17: Potenciación del efecto de *Rhizobium lotii* en plantas *Lotus japonicus* mediante la aplicación de metabolitos de *Trichoderma* (HYT = HYTLO1 a 0,07 □M, 6PP a 0,002 □M, HA = Ácido harcíánico a 0,001 □M). Ts+Rhiz = tratamiento con *R. lotii*, Ts-Rhiz sin *R. lotii*. (D) Crecimiento medido después de 4 semanas, en ausencia (cont) o presencia de *Rhizoba R. lotii* ((+) Rhiz). Las moléculas purificadas se añadieron al medio MS estéril y se vertieron en placas de Petri. Los datos se registraron 4 semanas después de la siembra de *L. japonicus*.

Fig. 18. Mejora de la formación de nódulos mediante el tratamiento de *R. lotii* actuando *L. japonicus* agregando diferentes metabolitos de *Trichoderma spp.* (HYT = HYTLO1 a 0,07 □M, 6PP a 0,002 □M, HA = Ácido harcíánico a 0,001 □M). Ts = control con *R. lotii* sin metabolitos. Las moléculas purificadas se añadieron al medio MS estéril y se vertieron en placas de Petri. Se indica el número medio de nódulos por cm de raíz. Los datos se registraron 4 semanas después de la siembra de *L. japonicus*.

15 Descripción detallada de la invención

Las especies de *Trichoderma* son conocidas por sus efectos beneficiosos sobre la salud y el crecimiento de las plantas. Sin embargo, los beneficios registrados de las especies de *Trichoderma* están en su mayoría restringidos a *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum* y *T. atroviride*. *T. longibrachiatum* en general, se considera menos en asociación con efectos beneficiosos sobre las plantas o para su uso como agente de control biológico. En cambio, esta especie se describe científicamente y se utiliza comercialmente en relación con la producción de enzimas que degradan la biomasa vegetal. Sin embargo, los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que *T. longibrachiatum* es capaz de producir una hidrofobina bioactiva, denominada HYTLO1, que tiene distintos efectos positivos en las plantas. Además, HYTLO1 tiene efectos negativos sobre varios patógenos vegetales. Por tanto, HYTLO1 puede utilizarse en el tratamiento de plantas. Los efectos positivos de *T. longibrachiatum* en plantas se pueden seleccionar de la modulación del crecimiento de las plantas y/o el control de enfermedades, incluida la prevención de enfermedades y/o la estimulación de la resistencia sistémica.

La modulación debe entenderse como cualquier cambio o alteración, incluidas las alteraciones que puedan considerarse mejoras (aumentos), pero también alteraciones que pueden considerarse reducciones (disminuciones). Se prefieren las modulaciones que pueden considerarse mejoras o aumentos (estimulaciones). Como entenderá el experto en la materia, la modulación del crecimiento de las plantas puede entenderse como una referencia a la modulación de los parámetros de crecimiento de las plantas. La modulación de los parámetros de crecimiento de las plantas puede establecerse con referencia a un control sin tratar. Por ejemplo, el parámetro de crecimiento de la planta puede ser el desarrollo de las raíces. El desarrollo de las raíces puede evaluarse con cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo, tal como se ejemplifica en los ejemplos. Según el uso reivindicado, la modulación del crecimiento de las plantas es la mejora (estimulación) de la nodulación de las raíces en una planta de la familia Leguminosae (o denominada alternativamente Fabaceae). El experto en la materia sabrá y comprenderá que los nódulos radiculares son órganos radiculares de leguminosas que contienen rizobios simbióticos capaces de fijar nitrógeno atmosférico. La nodulación radicular es el proceso de formación de nódulos radiculares. La planta de la familia Leguminosae puede seleccionarse como se presentó anteriormente. *Glycine max* (soja) se selecciona con especial preferencia en relación con la estimulación de la nodulación radicular. La estimulación (mejora) de la nodulación puede ser un aumento de la densidad del nódulo y puede evaluarse basándose en esto, tal como se ejemplifica en los ejemplos.

Un parámetro de crecimiento vegetal alternativo que se puede modular, que no está dentro del uso reivindicado, es el porcentaje de germinación. El porcentaje de germinación se puede evaluar con cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo, usando un hemocitómetro.

Otro parámetro de crecimiento adicional que puede modularse, que tampoco está dentro del uso reivindicado, es la velocidad de germinación. La velocidad de germinación se puede evaluar con cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo, usando un hemocitómetro.

Se ha descubierto que *T. longibrachiatum* además de la modulación del crecimiento de las plantas, también tiene efectos beneficiosos sobre el control de enfermedades (tampoco dentro del uso reivindicado). El control de enfermedades debe entenderse en el sentido de incluir tanto la prevención de enfermedades como el tratamiento de una enfermedad. Las enfermedades que se pueden controlar eficazmente con *T. longibrachiatum* incluyen, pero no se limitan a enfermedades fúngicas, tales como enfermedades fúngicas causadas por patógenos fúngicos transmitidos por el suelo como *Rhizoctonia spp.*, por ejemplo *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp.* *Fusarium graminearum*, *Pythium spp.*, por ejemplo *Pythium ultimum*, o enfermedades fúngicas causadas por patógenos fúngicos transmitidos por el aire, tales como *Alternaria spp.* *Alternaria alternata*, *Botrytis spp.* por ejemplo *Botrytis cinerea*, pero también enfermedades causadas por patógenos bacterianos como *Xantomonas spp.*, por ejemplo

Xantomonas campestris,

El control de enfermedades puede proceder por efectos directos sobre el patógeno de la planta, pero también puede proceder mediante la estimulación de la resistencia sistémica. La resistencia sistémica inducida (ISR) de las plantas es un fenómeno bien conocido por el experto en la materia en donde, provocado por una infección local, las plantas responden con una cascada de señalización que conduce a la expresión sistémica de un amplio espectro y una resistencia duradera a las enfermedades que es eficaz contra, entre otros hongos, bacterias y virus. La resistencia sistémica inducida está asociada, entre otras cosas, con la activación de las respuestas de defensa de las plantas, que puede incluir "explosión oxidativa", síntesis de fitoalexinas, acumulación de proteínas PR (relacionadas con la patogénesis), muerte celular programada localizada también conocida como HR (respuesta hipersensible), etc.

La planta seleccionada para el tratamiento es de la familia *Leguminosae*, tal como del género *Gycine*, por ejemplo *Glycine max* (soja), del género *Phaseolus*, del género *Pisum*, por ejemplo *Pisum sativum* (guisante), del género *Cicer*, por ejemplo *Cicer arietinum*, del género *Medicago*, por ejemplo *Medicago sativa* (alfalfa), del género *Arachis*, por ejemplo *Arachis hypogaea* (cacahuete), del género *Ceratonía*, por ejemplo *Ceratonía siliqua* (algarroba), del género *Glycyrrhiza*, por ejemplo *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), o del género *Lupinus*, por ejemplo *Lupinus angustifolius*. El experto sabrá que de las especies de plantas mencionadas anteriormente, hay varias variedades disponibles para el cultivo. Se debe considerar que la referencia para una especie vegetal específica incluye las diversas variedades disponibles. La planta seleccionada puede estar en cualquier etapa de desarrollo, como una semilla, una plántula, una planta joven en desarrollo o una planta completamente desarrollada.

Los inventores de la presente invención han descubierto que los efectos anteriores de *T. longibrachiatum* en plantas están unidas a la proteína HYTLO1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Esta proteína se ha encontrado en el secreotoma de *T. longibrachiatum* cepa MK1. Sin embargo, se cree que las cepas adicionales de *T. longibrachiatum* pueden expresar proteínas que tienen secuencias de aminoácidos similares a la proteína HYTLO1. Por tanto, la invención en general se refiere al uso de *Trichoderma longibrachiatum* para el tratamiento de una planta. La *Trichoderma longibrachiatum* es en particular de una cepa que comprende una secuencia de nucleótidos autóloga que codifica una proteína que tiene al menos un 90 % de similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, tal como *Trichoderma longibrachiatum* cepa MK1. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos puede ser la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

Como comprenderá el experto a partir de sus conocimientos de biología molecular, una secuencia de nucleótidos que codifica secuencias de proteínas puede ser una secuencia de ADN y/o una secuencia de ARN. El experto comprenderá además que una secuencia de nucleótidos autóloga es una secuencia de nucleótidos presente en el genoma autólogo de un organismo, es decir, no se introduce de una fuente externa, es decir, no es una secuencia heteróloga. Por lo tanto, la *T. longibrachiatum* utilizada en la invención no está modificada genéticamente con respecto a la proteína HYTLO1. Preferentemente, la *T. longibrachiatum* seleccionada no comprende ninguna secuencia de nucleótidos extraña introducida artificialmente, es decir, es un organismo no modificado genéticamente.

La secuencia de nucleótidos autóloga codifica una proteína que tiene al menos un 90 % de similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Dentro de la presente invención, al menos el 90 % de similitud debe entenderse en el sentido de más del 90 %, tal como al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % de similitud de secuencia.

Tal como entenderá el experto en la materia, "similitud de secuencia" se refiere al grado en que las secuencias de nucleótidos o péptidos individuales son similares. El grado de similitud entre dos secuencias se basa en el grado de identidad combinado con el grado de cambios conservativos. El porcentaje de "similitud de secuencia" es el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que es idéntico o conservativamente cambiado, es decir, "similitud de secuencia" = (% de identidad de secuencia) + (% de cambios conservativos).

A los efectos de esta invención, los "cambios conservativos" y la "identidad" se consideran especies del término más amplio "similitud". Por lo tanto, siempre que se utiliza el término "similitud" de secuencia, abarca "identidad" de secuencia y "cambios conservativos". Según determinadas realizaciones, los cambios conservativos se descartan y el % de similitud de secuencia se refiere al % de identidad de secuencia.

El experto conoce el término "identidad de secuencia". Para determinar el grado de identidad de secuencia compartida por dos secuencias de aminoácidos o por dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Tal alineación puede llevarse a cabo en todas las longitudes de las secuencias que se comparan. Como alternativa, la alineación puede realizarse en una longitud de comparación más corta, por ejemplo más de 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más ácidos nucleicos/bases o aminoácidos.

Después se comparan los restos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de

aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El grado de identidad compartido entre secuencias se expresa típicamente en términos de porcentaje de identidad entre las dos secuencias y es una función del número de posiciones idénticas compartidas por restos idénticos en las secuencias (es decir, % de identidad = número de restos idénticos en posiciones correspondientes/número total de posiciones x 100). Preferentemente, las dos secuencias que se comparan tienen la misma o sustancialmente la misma longitud.

El porcentaje de "cambios conservativos" se puede determinar de forma similar al porcentaje de identidad de secuencia. Sin embargo, en este caso, los cambios en una ubicación específica de una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que es probable que conserven las propiedades funcionales del resto original se puntúan como si no hubiera ocurrido ningún cambio.

Para las secuencias de aminoácidos, las propiedades funcionales relevantes son las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos. Se puede seleccionar una sustitución conservativa de un aminoácido en un polipéptido de la invención entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, es bien conocido en la técnica de la bioquímica de proteínas que un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular (como carga, hidrofobicidad e hidrofiliidad) puede sustituirse por otro aminoácido sin alterar sustancialmente la actividad de una proteína, particularmente en regiones de la proteína que no están directamente asociadas con la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson, *et al.*, Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224 -4ª edición 1987). Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las sustituciones conservadoras incluyen, por ejemplo, Lys por Arg y viceversa para mantener una carga positiva; Glu por Asp y viceversa para mantener una carga negativa; Ser por Thr y viceversa para que se mantenga un -OH libre; y Gln por Asn y viceversa para mantener un -NH₂ libre.

De acuerdo con la presente invención, las sustituciones conservativas en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se pueden realizar de acuerdo con las que se establecen a continuación como sigue:

Sustituciones conservativas de aminoácidos

Resto original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Para las secuencias de nucleótidos, la propiedad funcional relevante es principalmente la información biológica que un determinado nucleótido lleva dentro del marco de lectura abierto de la secuencia en relación con la maquinaria de transcripción y/o traducción. Es de conocimiento común que el código genético tiene degeneración (o redundancia) y que múltiples codones pueden llevar la misma información con respecto al aminoácido que codifican. Por ejemplo, en ciertas especies, el aminoácido leucina está codificado por los codones UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG (o TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG para ADN), y el aminoácido serina es especificado por UCA, UCG, UCC, UCU, AGU, AGC (o TCA, TCG, TCC, TCT, AGT, AGC para ADN). Los cambios de nucleótidos que no alteran la información traducida se consideran cambios conservativos.

El experto en la materia será consciente del hecho de que varios programas informáticos diferentes, utilizando

diferentes algoritmos matemáticos, están disponibles para determinar la identidad entre dos secuencias. Por ejemplo, se puede hacer uso de un programa informático que emplee el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, Journal of Molecular Biology, 48, 443-453). Según una realización, el programa informático es el programa GAP del paquete informático Accelrys GCG (Accelrys Inc., San Diego, EE. UU. A). Las matrices de sustitución que se pueden utilizar son, por ejemplo, una matriz BLOSUM 62 o una matriz PAM250, con una ponderación de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El experto en la materia apreciará que todos estos parámetros diferentes producirán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje total de identidad de dos secuencias no se altera de forma significativa cuando se usan diferentes algoritmos.

- 10 De acuerdo con una realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete informático Accelrys GCG (Accelrys Inc., San Diego US A) Una matriz NWSgapdna CMP y una ponderación de espacio de 40, 50, 60, 70, u 80 y se usa una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

- En otra realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se determina utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Meyers y Miller, 1989, Bull. Math. Biol. 51, 5-37) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0) (disponible en ALIGN Query utilizando datos de secuencia del servidor Genestream IGH Montpellier France <http://vegajgh.mrs.fr/bin/align-guesss.cgi>) utilizando una tabla de restos de ponderación PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

- 20 Para la presente invención, lo más preferido es usar BLAST (Herramienta de alineación local básica) para determinar el porcentaje de identidad y/o similitud entre secuencias de nucleótidos o aminoácidos.

- Las consultas que utilizan los programas BLASTn, BLASTp, BLASTx, tBLASTn y tBLASTx de Altschul et al. (1990) se pueden publicar a través de las versiones en línea de BLAST accesibles a través de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Como alternativa, una versión independiente de BLAST (por ejemplo, versión 2.2.24 (publicada el 23 de agosto de 2010)) que se puede descargar también a través del sitio de Internet del NCBI. Preferentemente, las consultas de BLAST se realizan con los siguientes parámetros. Para determinar el porcentaje de identidad y/o similitud entre secuencias de aminoácidos: algoritmo: blastp; tamaño de palabra: 3; matriz de puntuación: BLOSUM62; costes por hueco: Existencia: 11, Extensión: 1; ajustes de composición: ajuste de la matriz de puntuación composicional condicional; filtro: apagado; máscara: apagado. Para determinar el porcentaje de identidad y/o similitud entre secuencias de nucleótidos: algoritmo: blastn; tamaño de palabra: 11; coincidencias máximas en un intervalo de consulta: 0; puntuaciones de coincidencia/falta de coincidencia: 2, -3; costes por hueco: Existencia: 5, Extensión: 2; filtro: regiones de baja complejidad; máscara: máscara solo para la tabla de búsqueda.

- 35 El porcentaje de "cambios conservativos" se puede determinar de forma similar al porcentaje de identidad de secuencia con la ayuda de los algoritmos y programas informáticos indicados. Algunos programas informáticos, por ejemplo, BLASTp, presentan el número/porcentaje de positivos (= similitud) y el número/porcentaje de identidad. El porcentaje de cambios conservativos puede derivarse de ello restando el porcentaje de identidad del porcentaje de positivos/similitud (porcentaje de cambios conservativos = porcentaje de similitud - porcentaje de identidad).

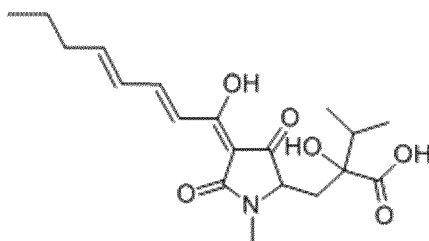
- 40 Cabe señalar que una secuencia de aminoácidos que tiene más del 90 % de similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se describe en la técnica con el número de referencia de Genbank EF419429. Esta proteína (y la secuencia de nucleótidos que la codifica) se identifica como originaria de *Trichoderma harzianum* T22. Sin embargo, un análisis adicional basado en pruebas moleculares realizadas por los inventores de la presente invención ha demostrado que *Trichoderma harzianum* T22 no comprende ninguna secuencia de nucleótidos que codifique una secuencia de aminoácidos que tenga más del 90 % de similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Por tanto, la divulgación de la entrada EF419429 de Genbank es incorrecta y no está habilitada con respecto a la fuente de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos presentadas.

- 50 Según determinadas formas de realización del uso reivindicado, el uso de la biomasa de *Trichoderma longibrachiatum*, o del producto que comprende la proteína que proviene de dicha biomasa, se combina con el uso de uno o más bioestimulantes vegetales seleccionados de (i) una especie de *Trichoderma* distinta de *Trichoderma longibrachiatum*, (ii) ácido hirciánico o un isómero biológicamente activo del mismo, tal como, ácido isohirciánico, (iii) 6-pentil- α -pirona o (iv) rizobios. HA, iso-HA y 6PP son metabolitos conocidos de especies de *Trichoderma* que tienen efectos beneficiosos sobre las plantas. Combinado con *Trichoderma longibrachiatum* y en particular la proteína HYTL01 de *Trichoderma longibrachiatum* o una proteína similar más diferente de especies de *Trichoderma*, dichos agentes fitoestimulantes proporcionan efectos adicionales en las plantas con respecto a (a) la modulación del crecimiento de las plantas, tal como la mejora del peso fresco de la planta, la mejora del peso seco de la planta, la mejora del desarrollo radicular, incluyendo una mejor nodulación en Leguminosae, aumento del porcentaje de germinación y/o aumento de la velocidad de germinación, o (b) control de enfermedades, por ejemplo mediante actividad antimicrobiana, preferentemente actividad antifúngica, o mediante estimulación de la resistencia sistémica. Estos efectos adicionales según determinadas realizaciones pueden extenderse a niveles sinérgicos.

Las especies de *Trichoderma* diferentes de *Trichoderma longibrachiatum* que tienen características estimulantes de

las plantas pueden ser fácilmente identificadas por el experto y pueden, por ejemplo, seleccionarse de *T. harzianum* (por ejemplo, cepa T22), *T. atroviride* (por ejemplo, cepa P1), *T. asperellum*, *T. virens* (por ejemplo, cepa GV41).

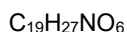
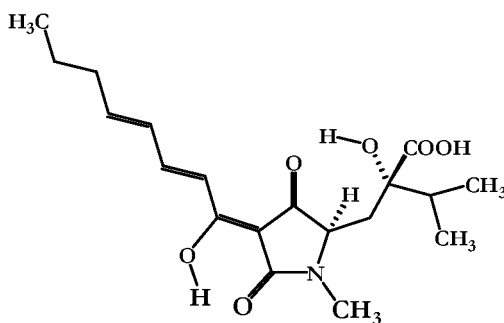
El ácido harcianico (CAS: 157148-06-6) o, como alternativa, HA es un compuesto alcaloide de la fórmula estructural 5 (1) a continuación, que tiene la fórmula química $C_{19}H_{27}NO_6$ y un PM de 365,42.



Fórmula 1

El HA es comercializado por varias partes y, entre otros, puede obtenerse en una forma adecuada de CHEMFACES (<http://www.chemfaces.com/natural/Harzianic-acid-CFN00118.html>). En el contexto de la presente invención, el término ácido harcianico incluye todos los isómeros estereoquímicos del compuesto de fórmula 1, como el ácido isoharcianico.

El ácido isoharcianico o, como alternativa, iso-HA es un estereoisómero de HA con la fórmula estructural (2) a continuación, que tiene la fórmula química $C_{19}H_{27}NO_6$ y un PM de 365,42.



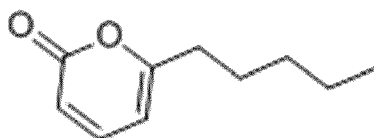
Masa exacta: 365,18384

Peso mol.: 365,42078

ácido 2-hidroxi-2-[4-(1-hidroxi-octa-2,4-dieniliden)-1-metil-3,5-dioxopirrolidin-2-ilmetil]-3-metil-butírico

Fórmula 2

6-Pentil- α -pirona (CAS: 27593-23-3) o, como alternativa, 6PP es un compuesto de la fórmula estructural (3) a continuación que tiene la fórmula química $C_{10}H_{14}O_2$ y un PM de 166,216. Es comercializado por varias partes y puede, entre otros, obtenerse en una forma adecuada de SIGMA.



Fórmula 3

Los rizobios son bacterias fijadoras de nitrógeno capaces de vivir en una relación simbiótica con plantas de la familia Leguminosae. El experto sabrá que los rizobios pueden tener una cierta especificidad de hospedador y está dentro del ámbito del conocimiento de la persona experta seleccionar rizobios capaces de vivir en una relación simbiótica con una planta seleccionada de la familia Leguminosae. De acuerdo con la presente invención, se puede usar cualquier rizobio que tenga especificidad para una planta seleccionada de la familia *Leguminosae*, tal como del género *Glycine*,

por ejemplo *Glycine max* (soja), del género *Phaseolus*, del género *Pisum*, por ejemplo *Pisum sativum* (guisante), del género *Cicer*, por ejemplo *Cicer arietinum*, del género *Medicago*, por ejemplo *Medicago sativa* (alfalfa), del género *Arachis*, por ejemplo *Arachis hypogaea* (cacahuete), del género *Ceratonia*, por ejemplo *Ceratonia siliqua* (algarroba), del género *Glycyrrhiza*, por ejemplo *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), o del género *Lupinus*, por ejemplo *Lupinus angustifolius*. Los rizobios, por ejemplo, pueden seleccionarse del género *Rhizobium* tal como *R. leguminosarum*, *R. tropici*, *R. loti*, *R. trifolii*, *R. meliloti*, *R. fredii*, *R. cellulosilyticum*, *R. daejeonense*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. French*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. loessense* o *huanglingense*, *R. lusitanum*, *R. mongolense*, *R. sullae* o *hedysari*, *R. undicola* (ex *Allohrizobium undicola*), *R. Yanglingense* o del género *Bradyrhizobium*, tal como *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. diazoefficiens*, *B. liaoningense* *B. yuanmingense*, *B. canariense* o del género *Mesorhizobium* como *M. albiziae*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. ciceri* (ex *Rhizobium ciceri*), *M. huakuii* (ex *Rhizobium huakuii*), *M. loti* (ex *Rhizobium loti*), *M. mediterraneum* (ex *Rhizobium mediterraneum*), *M. plurifarum*, *M. septentrionale*, *M. temperatum*, *M. tianshanense* (ex *Rhizobium tianshanense*), o del género *Azorhizobium* como *A. caulinodans*, *A. doebereineriae* o *johannae* o del género *Methylobacterium* como *M. nodulans* o del género *Ensifer* (ex *Sinorhizobium*) como *E. abri*, *E. americanum*, *E. arboris*, *E. fredii* (ex *Rhizobium fredii*), *E. indiaense*, *E. kostiense*, *E. kummerowiae*, *E. medicae*, *E. meliloti* (ex *Rhizobium meliloti*), *E. mexicanum*, *E. morelense* (también conocido como "E. adhaerens"), *E. adhaerens*, *E. sahelii* o *sahelense*, *E. terangae*, *E. Xinjiangense*, o combinaciones de los mismos. Dada la importancia comercial de este cultivo, de acuerdo con ciertas realizaciones, los rizobios seleccionados son preferentemente "rizobios de soja" capaces de formar nódulos radiculares en la soja (*Glycine max*), tal como por ejemplo *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Ensifer fredii*, *Ensifer xinjiangense*, *Mesorhizobium tianshanense* u otros conocidos por el experto en la materia.

La fuente de la proteína se puede proporcionar en una composición. La composición preferentemente es una composición agronómica, en particular, una composición agronómica destinada a mejorar la nodulación radicular en Leguminosae. El vehículo se puede seleccionar de cualquier vehículo adecuado, tal como un vehículo agronómicamente aceptable. La selección de vehículos adecuados está dentro del ámbito del conocimiento del experto. Los vehículos o coformulantes adecuados podrían ser arcilla, arenas, carbón activo, para formulaciones sólidas o lactosa/celulosas para inmovilización y dispersión de formulaciones sólidas y líquidas. HYTLO1 y HA se pueden disolver en etanol o metanol a baja concentración 10^{-3} M y diluido en agua a 10^{-5} a 10^{-6} M para la aplicación. 6PP podría disolverse en acetato de etilo o acetona a 10^{-3} M para disolver más en agua a 10^{-5} a 10^{-6} M para la aplicación. Se podrían agregar a la composición antioxidantes como benzotriazol, benzofenona, acrilato para aumentar la vida útil. Se podrían agregar formulaciones líquidas a una formulación sólida a base de esporas de *Trichoderma* vivo u otro microbio para potenciar el efecto. El principio activo podría prepararse mediante liofilización, secado por pulverización, secado por lecho fluido, secado al vacío, secado en bandeja o estabilización líquida tamponando el pH. Por último, se podría realizar el diseño de la formulación final, pero sin limitación, procesando la proteína pura o cruda en mezcla mezclada en polvos o disuelta en líquidos o disolventes. Para aplicación en agricultura, las formulaciones se optimizarán de modo que se aplique una cantidad de 30 ml (30 g si se seca) a 5 litros (5 kg si se seca) de producto formulado por 1 hectárea de cultivo. La aplicación al cultivo puede ser por cualquier medio conocido, tal como mediante el uso de sistemas de riego por goteo, empapado, nebulización o aspersión o cualquier otro sistema de aplicación en cultivos.

Una fuente de proteína debe entenderse como una fuente adecuada para proporcionar la proteína. En la composición, la fuente de la proteína puede ser la biomasa de una cepa de *Trichoderma longibrachiatum*, tal como *Trichoderma longibrachiatum* cepa MK1 depositada como CBS 137023, preferentemente biomasa viable. El experto entenderá que en caso de que la fuente se seleccione como biomasa viable, la proteína no necesita estar presente, sino que puede expresarse *in situ* en una etapa posterior. Este es en particular el caso cuando se seleccionan esporas viables como biomasa. Como alternativa, la fuente de la proteína puede ser un producto que proviene de dicha biomasa, tal como un extracto al menos parcialmente purificado. En la composición, la proteína se proporciona preferentemente a partir de una fuente en la que se encuentra en un estado o forma purificada. Un estado o forma purificada debe entenderse como un estado en el que la proteína es más pura que en su estado original, es decir, se limpia y/o se separa de elementos extraños y/o elementos presentes en el entorno del que se origina. En una forma o estado purificado, la proteína no necesita ser 100 % pura. En su lugar, puede tener una pureza de, por ejemplo, 40-99,9 %, tal como el 50-99 %, o el 60-95 %, o el 70-90 %, o el 80-90 %, o el 85-90 %.

El contenido de proteína en la composición puede estar entre el 100 % en p/p (proteína pura) y 0,1 ppb ($1 \cdot 10^{-10}$) o, tal como entre el 10 % en p/p y 0,1 ppb, entre el 5 % en p/p y 1 ppb, entre el 1 % en p/p y 5 ppb, entre el 0,1 % en p/p y 10 ppb, basado en la actividad demostrada en los ensayos de los presentes inventores.

Similar al uso de la fuente de proteína autóloga de *Trichoderma longibrachiatum* que tiene al menos un 90 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 discutida anteriormente, también en la composición, la proteína se puede combinar con uno o más bioestimulantes vegetales, como los seleccionados de (i) una especie de *Trichoderma*, preferentemente una especie de *Trichoderma* distinta de *Trichoderma longibrachiatum*, (ii) ácido hirciánico, o un isómero biológicamente activo del mismo, tal como ácido isohirciánico o (iii) 6-pentil- α -pirona. Los detalles sobre la especie de *Trichoderma*, HA, iso-HA y 6PP añadidos

además de la proteína HYTLO1 (o una proteína similar) se proporcionan anteriormente. En la composición de la invención las especies de *Trichoderma* se pueden agregar en una cantidad del 0,01 % al 100 % de principio activo y HA y 6PP pueden agregarse en el mismo intervalo de concentración que HYTLO1.

5 Un método para producir una proteína autóloga de *Trichoderma longibrachiatum* que tiene al menos un 90 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 comprende:

- proporcionar *Trichoderma longibrachiatum* que comprende un gen autólogo funcional que codifica la proteína;
- cultivar biomasa de *Trichoderma longibrachiatum* en condiciones adecuadas para la expresión del gen

10 - obtener la proteína del cultivo de biomasa.

En el método de producción se proporciona *Trichoderma longibrachiatum* que comprende un gen autólogo funcional que codifica la proteína que tiene al menos un 90 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Basándose en las secuencias proporcionadas, el experto en la materia puede determinar si una determinada cepa de *T. longibrachiatum* comprende un gen autólogo funcional que codifica la proteína. En el método, tal vez se prefiera utilizar una cepa de *T. longibrachiatum* desprovista de ADN extraño (heterólogo) insertado artificialmente, es decir, una cepa no modificada genéticamente. Por ejemplo se puede seleccionar *T. longibrachiatum* cepa MK1. Tal como entenderá el experto en la materia, en la cepa de *T. longibrachiatum* no modificada genéticamente, y cualquier proteína aislada de la misma cualquier secuencia de nucleótidos presente estará libre de secuencias de nucleótidos de un organismo diferente. Como se sabe, los productos obtenidos mediante el uso de modificación genética (productos GM o GMO) son recibidos con reservas e incluso prohibidos por ciertos grupos de consumidores. Además, en varias jurisdicciones se pueden aplicar regulaciones especiales para traer organismos GM y productos derivados de ellos al medio ambiente. En vista de esto, la producción no transgénica tiene ciertos beneficios. *T. longibrachiatum* puede proporcionarse en cualquier forma viable adecuada, tal como en forma de esporas y/o biomasa de hifas.

En el método de producción de biomasa de *T. longibrachiatum* se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión del gen. El cultivo puede ser en una fermentación en estado sólido o en una fermentación líquida o semisólida. Se prefiere cultivar *T. longibrachiatum* en una fermentación líquida. El experto en la materia podrá determinar las condiciones de cultivo adecuadas tanto para las fermentaciones en estado sólido como para la fermentación líquida para permitir el crecimiento de *T. longibrachiatum* y la expresión del gen. Por ejemplo, *T. longibrachiatum* se puede cultivar en medio Murashige y Skoog + el 0,8-1,3 %, tal como sacarosa al 1 % para 6-8, tal como 7 días a 23-27 °C, tal como 25 °C bajo aireación, por ejemplo, agitando a 150 rpm.

Del cultivo de biomasa se obtiene la proteína. La proteína se puede obtener a partir de la biomasa, preferentemente biomasa viable. Como alternativa, la proteína se puede aislar de la biomasa y/o el caldo de cultivo. Se cree que la proteína se secreta y también se une a la estructura del hongo que recubre la superficie externa. Los métodos para el aislamiento/purificación de proteínas a partir de biomasa cultivada son conocidos y/o pueden ser desarrollados fácilmente por el experto sin una carga excesiva. Para la proteína HYTLO1 (y proteínas similares), por ejemplo, se pueden usar los métodos presentados en el ejemplo 3. Se pueden utilizar otros métodos basados en técnicas cromatográficas que aprovechan el tamaño o las propiedades hidrófobas de las proteínas. Por ejemplo, un método para obtener la proteína podría ser mediante purificación de membrana, a partir de la centrifugación de la biomasa seguida del fraccionamiento del sobrenadante mediante un filtro de membrana con un corte final de 5 kD, obteniendo así la proteína de aproximadamente 7 kD. Otro método podría basarse en la cromatografía de adsorción o la cromatografía de lecho expandido (Birger *et al.*, 1999, Journal of Chromatography A, 865:129-144). Estos métodos podrían integrarse mediante extracción con un disolvente apropiado para compuestos hidrófobos.

Trichoderma longibrachiatum cepa MK1 (KV966) comprende una secuencia de nucleótidos autóloga que codifica una proteína que tiene al menos un 70 % de similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y, por lo tanto, puede usarse como fuente para obtener esta proteína, en particular como un producto no GM. Ha sido depositado en The Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda (CBS) el 10 de diciembre de 2013 bajo el número de depósito CBS 137023. La cepa se aisló de suelo natural en un campo agrícola y se identificó como *Trichoderma longibrachiatum* basándose en las características morfológicas y fisiológicas. Esta identidad se confirmó basándose en métodos moleculares utilizando el método del espaciador transcrito interno (ITS) (Schoch *et al.*, 2012, PNAS, 109:6241-6246). *Trichoderma longibrachiatum* cepa MK1 puede cultivarse con métodos adecuados para cultivar otras cepas de *Trichoderma longibrachiatum* conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, usando las condiciones de cultivo como se detalla anteriormente y como se ejemplifica en el experimento 3. Dentro de esta descripción, la referencia a *Trichoderma longibrachiatum* cepa MK1 se refiere a la cepa depositada con el número de depósito CBS 137023 o cualquier cepa equivalente, incluyendo cepas derivadas, que tienen sus rasgos característicos.

Las semillas tratadas con una fuente de una proteína que tiene al menos un 90 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, dicha proteína que se obtiene como una proteína autóloga de *Trichoderma longibrachiatum* son otro aspecto más de la invención. En la superficie de tales semillas estará

presente la proteína y/o la fuente de proteína. La semilla es de cualquier planta de la familia *Leguminosae*, preferentemente de una planta comercialmente relevante como se identificó anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para producir plantas de cultivo de la familia *Leguminosae* que emplea el uso de una fuente de proteína HYTLO1. El método comprende las etapas de:

- proporcionar el número de plantas de cultivo como semillas según la invención;
- proporcionar al número de semillas los nutrientes adecuados y las condiciones ambientales para su desarrollo.

10 En el método se proporcionan varias plantas. Se debe entender que varios significan uno o más e incluyen en particular una pluralidad. Las plantas se pueden seleccionar como cualquier planta de la familia *Leguminosae*, en particular, plantas comercialmente relevantes identificadas anteriormente. De nuevo, el experto sabrá que de las especies de plantas mencionadas anteriormente, hay varias variedades disponibles para el cultivo. Se debe considerar que la referencia para una especie vegetal específica incluye las diversas variedades disponibles. Las plantas se pueden
15 proporcionar como semillas, plántulas o plantas jóvenes en desarrollo.

En el método, el número de plantas proporcionado se trata con una fuente de proteína HYTLO1. El tratamiento puede comprender poner en contacto la planta con la fuente de proteína. Por ejemplo semillas, plántulas de plantas en desarrollo pueden ponerse en contacto con la fuente de proteína aplicando una solución líquida que comprende la
20 fuente de proteína. La solución líquida se puede aplicar mediante remojo como un empapado, regando o pulverizando. La solución líquida puede tener un contenido de proteína que varía desde proteína pura hasta 1×10^{-11} M, tal como el 50 % en p/v a 1×10^{-9} M, preferentemente 1×10^{-3} M hasta 1×10^{-9} M, tal como 1×10^{-5} M hasta 1×10^{-8} M, más preferentemente 5×10^{-6} M hasta 1×10^{-7} M.

25 En el método, el número de plantas se proporciona con los nutrientes y las condiciones ambientales adecuadas para permitir que la planta se desarrolle más. La selección de nutrientes adecuados (como N, P, S, CO₂) y las condiciones ambientales (tales como un sustrato de raíz adecuado, temperatura adecuada y condiciones de luz adecuadas) están dentro del ámbito del conocimiento del experto.

30 La invención se ilustrará y aclarará ahora adicionalmente con referencia a los siguientes experimentos ilustrativos.

Experimentos

1. Aislamiento y análisis de secuencia de la proteína HYTLO1 y el gen *Hyt1ol* de *Trichoderma longibrachiatum* cepa MK1.

El secretoma de *T. longibrachiatum* de bajo peso molecular se analizó mediante SDS-PAGE. Una proteína con un peso molecular estimado de aproximadamente 8 kDa resultó secretada profusamente cuando *T. longibrachiatum* se cultivó en medios líquidos añadidos con tejido vegetal, biomasa fúngica o celulosa. La banda, correspondiente a esta
40 proteína, se cortó del gel SDS-PAGE y se secuenció mediante el proceso de reacción de Edman. Se obtuvieron los primeros 15 restos de aminoácidos de la proteína. El análisis Blastp de este péptido proporciona homologías de nivel intermedio con la hidrofobina de varios hongos, incluidos *T. reesei*, *T. harzianum*, *Cladosporium fulvum*, *Ophiostoma ulmi*, *Claviceps purpurea* y *Magnaporthe grisea*. Los cebadores degenerados se sintetizaron de acuerdo con los restos de aminoácidos identificados y se realizó una ejecución en 3'. Los productos de la PCR se clonaron en el vector
45 pGEMt-Easy y se secuenciaron. El análisis blastx de una de las secuencias obtenidas, 445 pb de largo con nombre *Hyt1ol* (SEQ ID NO: 2), mostró homología con hidrofobinas fúngicas de clase II. La secuencia de ADNc de *Hyt1ol* resultó ser de 216 pb de largo y la traducción por simulación computacional dio una proteína predicha de 71 aa (SEQ ID NO: 1), con un peso molecular de 7218 Da y 8 restos de cisteína dispuestos en el motivo de hidrofobina X estrictamente conservado X_n-C-X₅₋₁₀-C-C-X₁₁₋₄₄-C-X₈₋₂₃-C-X₅₋₉-C-C-X₆₋₁₈-C-X_m. La copia genómica del gen *Hyt1ol* se obtuvo mediante
50 amplificación por PCR realizada en ADN genómico de *T. longibrachiatum*, mediante el uso de los cebadores Hyt1o1 directo (GCTGTCTGCCCTACCGGCC) e Hyt1ol inverso (TTACTGGGTGCCGAGGGC) diseñados en el 5' y 3' de la secuencia de ADNc de *Hyt1ol*. Resultó tener 361 pb de longitud, que contiene 2 intrones de 72 y 73 pb, respectivamente. La traducción por simulación computacional de la secuencia de ADN genómico de *Hyt1ol* se correspondió con la del ADNc.

55

2. Análisis de expresión del gen *Hyt1ol*.

El análisis Northern indicó que la transcripción del gen *Hyt1ol* de *T. longibrachiatum* estaba fuertemente activado cuando *T. longibrachiatum* se cultivó en un medio salino básico (SMS) en presencia de sacarosa, celulosa y quitina, y
60 menos en presencia de extractos de hojas de tomate, o filtrado de cultivo o paredes celulares de *R. solani* (Fig. 1).

3. Purificación de la proteína HYTLO1.

Se utilizaron cien microlitros de suspensión de 10^8 esporas de *T. longibrachiatum* MK1/ml para inocular matraces

Erlenmeyer que contenían 100 ml de Murashige y Skoog (medio base M&S) enriquecido con sacarosa al 1 %. Después de 7 días de crecimiento a 25 °C y 150 rpm (revoluciones por minuto) el filtrado del cultivo (CF) se separó de la biomasa mediante filtración con papel Miracloth (Calbiochem La Jolla, CA, EE.UU.) y posteriormente se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 min. El CF claro obtenido se vertió en un embudo separador, se agitó vigorosamente durante 5 minutos y se decantó durante 5 minutos más. En este punto, aparecieron dos fases diferentes, un líquido transparente y una espuma consistente en la superficie. Esta última se recuperó y se disolvió en etanol al 70 %. Contiene la proteína purificada. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo de proteína Bradford Dc (Bio-Rad, Richmond, CA, EE.UU.) o mediante el ensayo del kit de proteínas Qubit (Invitrogen) y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Este protocolo produce aproximadamente 1,5 mg de HYTLO1 puro a partir de 100 ml de filtrado de cultivo. Se procesaron alícuotas de la proteína en un SDS-PAGE y se tiñeron con plata para confirmar la purificación (Fig. 2).

4. HYTLO1 tiene un efecto inhibidor directo sobre los patógenos de las plantas (no de acuerdo con el uso reivindicado).

HYTLO1 purificado tuvo un efecto inhibidor directo sobre la germinación de esporas de *Botrytis cinerea* y *Alternaria* spp., pero no de *T. harzianum* como se muestra en la Fig.3. El efecto antifúngico de HYTLO1 de *T. longibrachiatum* también se probó en comparación con hidrofobinas similares (de tamaño similar) de dos cepas de *Trichoderma* diferentes, pero solo la HYTLO1 de *T. longibrachiatum* cepa MK1 presentó un fuerte efecto antifúngico en un ensayo de inhibición basado en ELISA (Fig. 4).

5. HYTLO1 tiene un efecto beneficioso en las plantas.

5a- HYTLO1 activa respuestas de defensa de plantas sistémicamente diferentes (no de acuerdo con el uso reivindicado).

Para verificar si los tratamientos con HYTLO1 inducen una estimulación *per se* de las reacciones de defensa de las plantas. Los presentes inventores aplicaron primero HYTLO1 purificado por inyección de hojas en tomate, y observaron bajo luz ultravioleta la acumulación de compuestos fluorescentes como una activación típica de las respuestas de defensa (Fig. 5). Los presentes inventores analizaron la reacción bioquímica de la planta a HYTLO1, que resultó estimulante para la formación del anión superóxido y peróxido de hidrógeno, para el anión superóxido dismutasa (SOD) y la actividad LOX, y la acumulación de la fitoalexina rishitina (Fig. 6). Estas respuestas también se han encontrado en hojas distantes del sitio de aplicación, demostrando así un efecto sistémico. Además, los presentes inventores descubrieron que el mismo tratamiento de hojas de tomate con HYTLO1 purificado indujo la activación de al menos 3 genes diferentes relacionados con la defensa que codifican la proteína PR (relacionada con la patogénesis) PR1, PR2 y PIN1, típicamente inducido por ácido salicílico y ácido jasmónico, como se demuestra mediante una amplificación por RT-PCR de los ARN relevantes (Fig. 7).

5b. HYTLO1 protege a las plantas de la infección por patógenos (no de acuerdo con el uso reivindicado).

Para determinar si HYTLO1 purificado es capaz de proteger a la planta de la infección foliar por un hongo patógeno, la proteína se probó en plantas adultas de tomate contra *Botrytis cinerea*. De hecho, la aplicación de cualquier concentración probada de HYTLO1 por encima de 1,25 µM (concentración de la solución de HYTLO1 de la cual se aplicaron 10 µl) redujo significativamente el tamaño del área necrótica en desarrollo causada por el patógeno hasta 72 horas después de la inoculación (Fig. 8). Esto demuestra que HYTLO1 se puede utilizar directamente como agente antimicrobiano para la protección de las plantas.

5c. HYTLO1 mejora el crecimiento y desarrollo de las plantas (no de acuerdo con el uso reivindicado).

Para investigar el efecto de HYTLO1 en el desarrollo de plantas, ya sea a nivel de germinación de semillas, formación y supervivencia de germen, formación de raíces, alargamiento y grosor del tallo, desarrollo foliar, así como el tamaño general de la planta, se realizaron diversos experimentos con la proteína purificada. Los ensayos realizados en esquejes demostraron que HYTLO1 en concentraciones tan bajas como 0,31 µM promovió el crecimiento y desarrollo de las raíces (Fig. 9). La proteína estimuló claramente la rizogénesis en diferentes plantas. Por ejemplo, las semillas de tomate germinadas en presencia de HYTLO1 aplicado en concentraciones de 10^{-6} a 10^{-9} M dio como resultado plántulas con un aparato radicular más del doble que el control sin tratar (datos no mostrados), mientras que los esquejes de tomate sumergidos en soluciones que contienen HYTLO1 0,075 y 0,018 µM, formó raíces de nueva aparición después de 15 días (no se observó formación de raíces en los controles) (Fig. 9). Se realizaron experimentos en plantas *in vivo* regando y pulverizando plantas de tomate con una solución de HYTLO1 0,01 µM tal como se describe en la leyenda de la Fig. 10. En estos experimentos, el efecto de HYTLO1 también se comparó con el de la cepa comercial de control biológico *T. harzianum* T22 (aplicado como suspensión de esporas según la tasa de aplicación típica de los productos comerciales) y el de la hormona germinativa ácido 1-naftalenacético (GERMON E - producido por L. Gobbi, Italia) (aplicado a la tasa de aplicación típica de los productos comerciales). Las aplicaciones se realizaron una vez por semana durante un mes regando las plantas de tomate. Los resultados, expresados en términos de altura

y longitud de la planta, longitud y peso de la raíz, número de hojas, diámetro y peso del tallo, se combinan y se muestran en la Fig. 10 y en la Fig. 11. El tratamiento con HYTLO1 aumentó todos los parámetros de crecimiento considerados en comparación con cualquiera de los otros tratamientos, así como con el control no tratado. El efecto de promoción del crecimiento de HYTLO1, además de en tomate, (*Solanáceas*) también se confirmó en especies de plantas representativas de otras familias de plantas (la Fig.12 muestra como ejemplos el efecto sobre *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*), *Cucumis sativus* (*Cucurbitaceae*), y *Lotus japonicus* (*Leguminosae*)). Los experimentos demuestran que HYTLO1 se puede utilizar eficazmente para promover el crecimiento y la productividad de una variedad de plantas de cultivo, así como para estimular la germinación de semillas y la formación de raíces.

10 6. La expresión transgénica del gen *Hyt1ol* mejora el crecimiento de las raíces y la resistencia a las enfermedades (no de acuerdo con el uso reivindicado).

Los presentes inventores obtuvieron varias líneas de plantas de tomate que expresan *Hyt1ol* utilizando un método de ensayo transitorio de *Agrobacterium tumefaciens* (ATA) o una transformación mediada por PVX (PVX::HYTLO1). Se seleccionaron algunas líneas basándose en una expresión positiva de *Hyt1ol*, tal como se detecta por análisis por transferencia de puntos y RT-PCT y se probó una capacidad mejorada para formar raíces, así como para la resistencia a la infección por *B. cinerea*. Cuando los esquejes de las plantas de tomate transgénicas seleccionadas se sumergieron en agua, rápidamente formaron muchas raíces de nueva aparición ya después de 12 días (no se formaron raíces en los controles) (Fig. 13). Cuando se probó la resistencia a enfermedades (*B. cinerea*), las tres líneas seleccionadas permitieron la formación de una lesión necrótica significativamente más pequeña en comparación con los controles no transformados y transformados con vector vacío (o el control transformado con una construcción PVX::GFP) (Fig. 14). Estos experimentos confirmaron aún más la actividad de promoción del crecimiento de plantas y anti-patógenos de HYTLO1, e indican que el gen *Hyt1ol* se puede utilizar de forma transgénica para mejorar el rendimiento agronómico de los cultivos.

25 7. HYTLO1 tiene un papel clave en la actividad de biocontrol de *T. longibrachiatum* (no de acuerdo con el uso reivindicado).

El papel de HYTLO1 en el biocontrol y el efecto de promoción del crecimiento vegetal de *Trichoderma longibrachiatum* fue demostrado por el uso de la inactivación dirigida del gen *Hyt1ol* mediante el uso de un método de transformación de protoplastos estándar basado en el tratamiento con polietilenglicol (PEG) (Punt *et al.*, 1987, Gene, 56:117-124). La falta de transcritos de *Hyt1ol* en unos pocos mutantes seleccionados al azar se confirmó mediante RT-PCR y análisis Northern. La tasa de crecimiento de los mutantes Δ -*Hyt1ol* seleccionados era la misma que la de tipo silvestre tanto en sustratos de crecimiento sólidos como líquidos, mientras que las esporas eran de color, forma y número similares a los del tipo silvestre. Sin embargo, los mutantes seleccionados se vieron fuertemente afectados al crecer *in vitro* contra *R. solani* o *P. ultimum* (datos no mostrados), y mostró una clara reducción *in vivo* de la actividad de biocontrol (Fig 15). Adicionalmente, el efecto negativo de la inactivación génica dirigida de *Hyt1ol* en la capacidad de promoción del crecimiento de las plantas de *T. longibrachiatum* cepa MK1 de tipo silvestre también se demostró *in vivo* (Fig. 16) tanto en términos de peso de la planta como de mejora de la longitud de la raíz. Estos experimentos demuestran claramente que HYTLO1 tiene un papel clave en la interacción positiva entre *Trichoderma longibrachiatum* y las plantas, y confirma además las propiedades beneficiosas de esta proteína.

45 8. HYTLO1 mejora el efecto beneficioso de los metabolitos secundarios de los hongos (no de acuerdo con el uso reivindicado).

Con el fin de demostrar aún más la utilidad de HYTLO1 para la promoción del crecimiento vegetal aplicado individualmente o en combinación con otras moléculas beneficiosas, los presentes inventores probaron el efecto combinado de la proteína con metabolitos secundarios producidos por diferentes especies de hongos, incluso *Trichoderma* spp. Los metabolitos probados incluyen 6PP y ácido hirciánico, y se realizaron experimentos sobre la germinación de semillas, elongación del tallo o la raíz, así como peso fresco/seco. Los resultados que se muestran en la Tabla 1 se obtuvieron utilizando semillas de pepino recubiertas con las soluciones de los compuestos probados, que luego se transfirieron en placas de Petri y se dejaron germinar en papel filtro húmedo. Se evaluó la germinación de la primera semilla, luego, las plántulas germinadas se trasplantaron a macetas que contenían tierra esterilizada. Otros dos tratamientos con las moléculas purificadas se realizaron en un intervalo de 10 días, empapando el suelo con las soluciones a las concentraciones finales de 10^{-7} M para 6PP y HA, y 10^{-8} M para HYTLO1. En la aplicación de dos compuestos, se utilizó la mitad de la dosis de cada molécula. En aplicaciones de tres compuestos, se utilizó un tercio de la dosis de cada molécula. Cada tratamiento consistió en 8 plantas. Los resultados se recogieron 30 días después del recubrimiento de la semilla. El control se produjo agregando agua en lugar de las soluciones de moléculas. El efecto de las cantidades mínimas de disolventes eventualmente contenidas en la solución de HA y 6PP fue probado preliminarmente, sin diferencias observadas en comparación con el control de agua. Los resultados muestran en la Tabla 1 que las tres moléculas probadas tienen un efecto beneficioso significativo sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas, y que pueden combinarse sinérgicamente para una eficacia mejorada. Se demostró la aparición de sinergia para los valores subrayados en la Tabla 1 utilizando la fórmula de Limpel, también modificada por Lorito *et al.*, (Lorito M., *et al.* 1994. Microbiology Reino Unido,140:623-629).

Tabla 1. Efecto de la aplicación combinada de HYTLO1, HA y 6PP sobre la germinación y promoción del crecimiento de semillas de pepino.

Tratamientos	Germinación de semillas (24h) DT +- 9 %	altura de la planta (cm) DT +- 2,5 cm	Longitud de la raíz (cm) DT +- 2,1 cm	Peso fresco de la planta (g) DT +- 2,5 g	Peso seco de la planta (g) DT +- 1,3 g
HYTLO1	78 %	24,9	14,6	24,76	8,4
% de aumento frente al control	+30 %		17,1	34,1	51,2
6PP	75 %	21,8	17,6	22,04	7,1
% de aumento frente al control	+25 %		31,1	25,9	42,3
HA	75 %	27,4	13,6	23,36	7,6
% de aumento frente al control	+25 %	8,4	10,7	30,1	46,1
HYTLO1+6PP	64 %	24,1	14,1	23,09	7,9
% de aumento frente al control	+6 %		14,2	29,3	48,1
HYTLO1 +HA	64 %	23,8	18,3	20,98	6,8
% de aumento frente al control	+6 %		33,6	22,2	39,7
HYTLO1 +HA+6PP	54 %	28,6	12,4	23,53	8,0
% de aumento frente al control		12,2		30,6	48,8

5 **9. HYTLO1 mejora el efecto beneficioso de los agentes de control biológico de *Trichoderma* spp. (no de acuerdo con el uso reivindicado).**

Con el fin de demostrar la utilidad de HYTLO1 para mejorar el efecto beneficioso de diferentes cepas de *Trichoderma* aplicadas comercialmente para el biocontrol, la proteína purificada se aplicó en combinación con dos cepas de *T. harzianum* (T22 y TH1) y una cepa de *T. asperellum* (CS1). Los resultados se muestran en la Tabla 2 y se expresan en términos de mayor longitud de tallo y raíz o peso fresco/seco. Las semillas de pepino se recubrieron con las soluciones de moléculas purificadas y/o suspensión de esporas, se transfirieron a placas de Petri y se dejaron germinar en papel de filtro húmedo. Las plántulas germinadas se trasplantaron a macetas que contenían suelo esterilizado. Otros dos tratamientos con las moléculas purificadas se realizaron en un intervalo de 7 días, empapando el suelo con las soluciones a las concentraciones finales de 10^{-8} M para HYTLO1 y 1 ml de una suspensión de 10^7 esporas/ml por 10 ml de suelo. En la aplicación de dos compuestos, se utilizó la mitad de la dosis de cada molécula. Cada tratamiento se realizó en al menos 8 plantas y los resultados se recopilaban 20 días después del recubrimiento de la semilla. Este experimento confirmó el efecto beneficioso ejercido por HYTLO1 solo y en combinación con especies de *Trichoderma* sobre el crecimiento de las plantas. El experimento demuestra que la presencia de HYTLO1 mejora el efecto de preparaciones de *Trichoderma* vivas hechas de diferentes principios activos. En particular, y solo a modo de ejemplo, el tratamiento combinado con *T. harzianum* T22 + HYTLO1 y *T. harzianum* cepa TH1 + HYTLO1 determinó un aumento significativo en el efecto de promoción del crecimiento de las plantas de hasta un 33 % más en comparación con los controles (los resultados sinérgicos según la fórmula de Limpel están subrayados en la Tabla).

25 **Tabla 2. Efecto de la aplicación combinada de HYTLO1, HA y 6PP y diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en la germinación de semillas de pepino y la promoción del crecimiento. Los valores son un aumento porcentual en comparación con el control del agua.**

Tratamiento	altura de la planta (cm) DT +- 1,5	Longitud de la raíz (cm) DT+- 2,0	Peso fresco de la planta (g) DT +- 2,8	Peso seco de la planta (g) DT +- 3,1
HYTLO1	1,8	8,5	4,2	7,3
TH1	9,5	3,5	1,4	9,1
T22	4,8	7,8	18,6	13,3
CS1	1,8	9,6	2,1	7,3
TH1+ HYTLO1	7,1	<u>23,4</u>	<u>30,0</u>	1,8
T22+ HYTLO1	14,3	5,5	<u>30,7</u>	16,4
CS1+ HYTLO1	8,9	<u>19,1</u>	6,3	5,5

10. **HYTLO1 mejora el efecto beneficioso de *Rhizobium* en plantas de Leguminosae.**

30

Para probar el efecto de HYTLO1, así como de los metabolitos secundarios HA y 6PP sobre la actividad promotora del crecimiento de rizobios, tales como *Rhizobium* sp., en plantas de Leguminosae, los presentes inventores utilizaron un *Rhizobium lotii* estándar en un sistema *in vitro* de *Lotus japonicus* (Barbulova *et al.*, 2005, Functional Plant Biology,

32:529-536). Se puntuó el crecimiento de las plantas y la densidad de nódulos radiculares cuatro semanas después de la siembra comparando los controles no tratados y los diversos tratamientos. Los resultados mostrados en la Fig.17 y la Fig.18 demuestran que HYTLO1, ya sea aplicado solo o en combinación con HA o 6PP mejora el efecto de promoción del crecimiento de las plantas de los rizobios, tales como *Rhizobium sp.*, en la planta, y que este fenómeno puede deberse a un mayor número de formación de nódulos en las raíces tratadas. Estos datos demuestran que HYTLO1 se puede utilizar para mejorar la eficacia y la utilidad de los rizobios, como los inóculos microbianos a base de *Rhizobium*, en términos de promoción del rendimiento agronómico de las plantas, así como en la fertilización del suelo debido a la fijación de nitrógeno por las bacterias noduladas.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Koppert B.V.

<120> Proteína bioactiva, uso de la misma y método para su producción

<130> 1.794.026 WOv2

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 71

<212> PRT

<213> *Trichoderma longibrachiatum* cepa MK1-KV966 (CBS 137023)

<400> 1

Ala	Val	Cys	Pro	Thr	Gly	Leu	Phe	Ser	Asn	Pro	Leu	Cys	Cys	Ser	Thr
1				5					10					15	

Asn	Val	Leu	Asp	Leu	Val	Gly	Val	Asp	Cys	Val	Thr	Pro	Thr	Ala	Ala
			20					25					30		

Val	Pro	Asp	Gly	Val	Phe	Phe	Gln	Ala	His	Cys	Ala	Ser	Lys	Gly	Lys
		35					40					45			

Gln	Pro	Leu	Cys	Cys	Val	Ala	Pro	Val	Ala	Lys	Gln	Gly	Val	Leu	Cys
	50					55					60				

Gln	Lys	Pro	Ile	Gly	Thr	Gln
65					70	

<210> 2

<211> 445

<212> ADN

<213> *Trichoderma longibrachiatum* cepa MK1-KV966 (CBS 137023)

<400> 2

ES 2 878 428 T3

gctgtctgcc ctaccggcct cttctccaac ccgctctgct gctccaccaa cgtcctcgac	60
ctcgtcggcg ttgactgcgt cacccccacc gccgctgtcc ccgatggcgt cttcttccag	120
gccactgcg cctccaaggg caagcagccc ctctgctgtg ttgctcccgt tgccaagcag	180
ggtgttctgt gccagaagcc catcggcacc cagtaaagca acggtttgct ttaccggcgg	240
cagtcttgag ttgccctcgg gcctcacaga ctggcatata tcattttggg ctcgcaaagt	300
ggaggatttt gaggggtttg aaggcctggg tttggcctag ttggaggggg aggattgggt	360
aatggcagct ttgcgaccag gacatagatg ttgatagagt gtgtagtcaa tacatatcag	420
aaaagttgga gaaaaaaaaa aaaaa	445

5 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador diseñado

<400> 3
 gctgtctgcc ctaccggcc 19

15 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador diseñado

<400> 4
 ttactgggtg ccgagggc 18

REIVINDICACIONES

1. Uso de biomasa de una cepa de *Trichoderma longibrachiatum* que comprende un gen autólogo que codifica una proteína que tiene al menos un 90 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o de un producto que comprende la proteína que proviene de dicha biomasa en donde la proteína se expresa como una proteína autóloga, para la mejora de la nodulación radicular en el tratamiento de una planta seleccionada de *Leguminosae*, en donde el porcentaje de similitud de secuencia es la suma del porcentaje de identidad de secuencia más el porcentaje de cambios conservativos, en donde un cambio de aminoácido es un cambio conservativo si se selecciona de una de las siguientes sustituciones:

10

Residuo original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el uso de la biomasa o del producto que comprende la proteína que proviene de la misma, se combina con el uso de uno o más bioestimulantes vegetales seleccionados de (i) una especie de *Trichoderma*, preferentemente una especie de *Trichoderma* distinta de *Trichoderma longibrachiatum*, (ii) ácido hirciánico, o un isómero biológicamente activo del mismo, tal como el ácido isohirciánico, (iii) 6-pentil- α -pirona o (iv) *rizobios*.

3. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en donde la biomasa es biomasa de la cepa *Trichoderma longibrachiatum* MK1 depositada como CBS 137023, preferentemente biomasa viable, tal como esporas viables.

20

4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

5. Semilla de una planta seleccionada de las *Leguminosae* tratadas con una composición, que comprende un portador, tal como un portador agronómicamente aceptable, y biomasa de una cepa de *Trichoderma longibrachiatum* que comprende un gen autólogo que codifica una proteína que tiene al menos un 90 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o un producto que comprende la proteína que proviene de dicha biomasa en donde la proteína se expresa como una proteína autóloga, en donde dicha semilla comprende en su superficie la biomasa o respectivamente el producto que comprende la proteína que proviene de dicha biomasa y en donde el porcentaje de similitud de secuencia es la suma del porcentaje de identidad de secuencia más el porcentaje de cambios conservativos, en donde un cambio de aminoácido es un cambio conservativo si se selecciona de una de las siguientes sustituciones:

25

30

Residuo original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln

(continuación)

Residuo original	Sustitución conservativa
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

6. Semilla de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición comprende además uno o más bioestimulantes de plantas tales como los seleccionados de (i) una especie de *Trichoderma*, preferentemente una especie de *Trichoderma* distinta de *Trichoderma longibrachiatum*, (ii) ácido hirciánico, o un isómero biológicamente activo del mismo, tal como el ácido isoharciánico, (iii) 6-pentil- α -pirona o (iv) rizobios.

7. Semilla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en donde la proteína tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

10 8. Método para cultivar una serie de plantas seleccionadas de las *Leguminosae* que comprende:

- proporcionar el número de plantas como un número de semillas de acuerdo con la reivindicación 5;
- proporcionar al número de semillas los nutrientes adecuados y las condiciones ambientales para su desarrollo.

15 9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la proteína tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

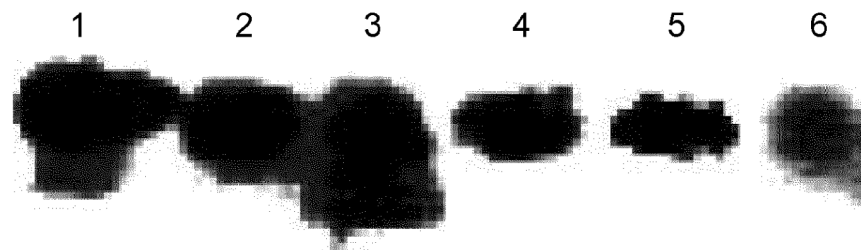


Fig. 1

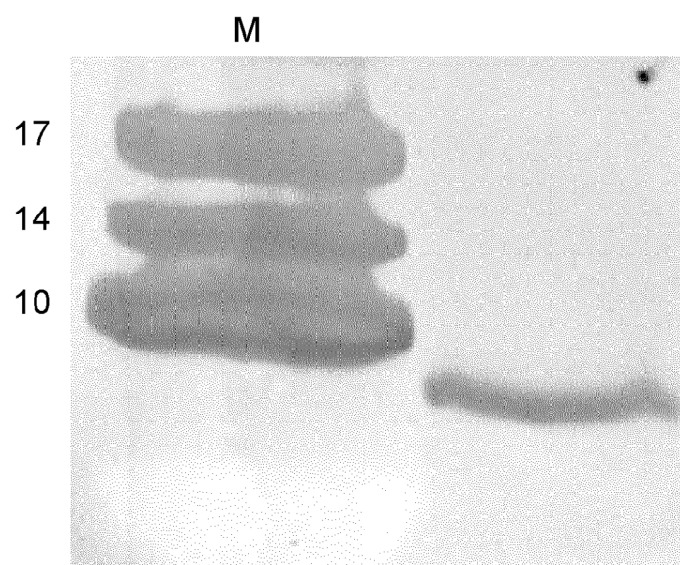


Fig. 2

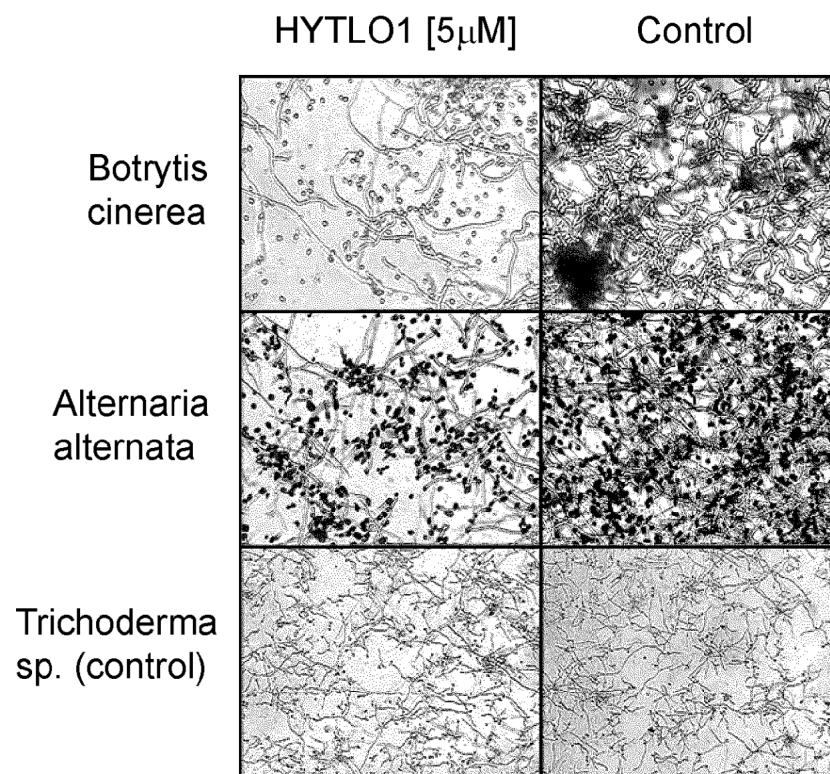


Fig. 3

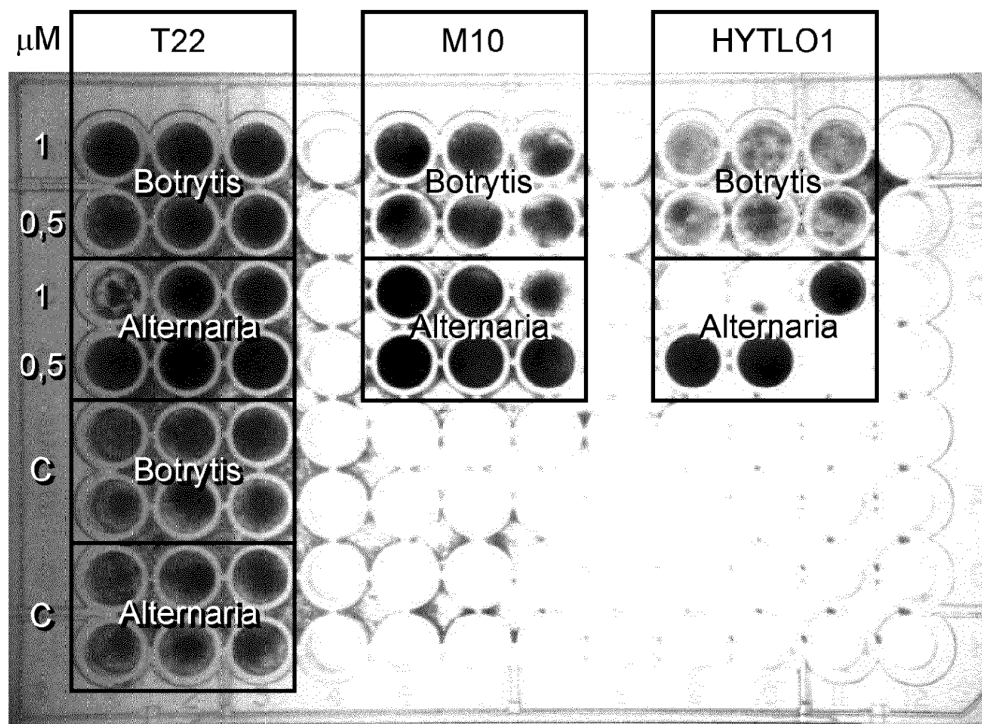


Fig. 4

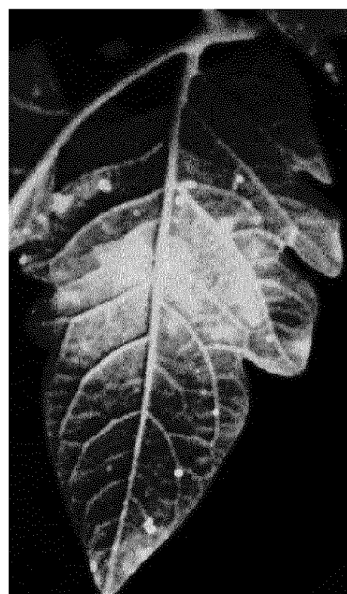


Fig. 5

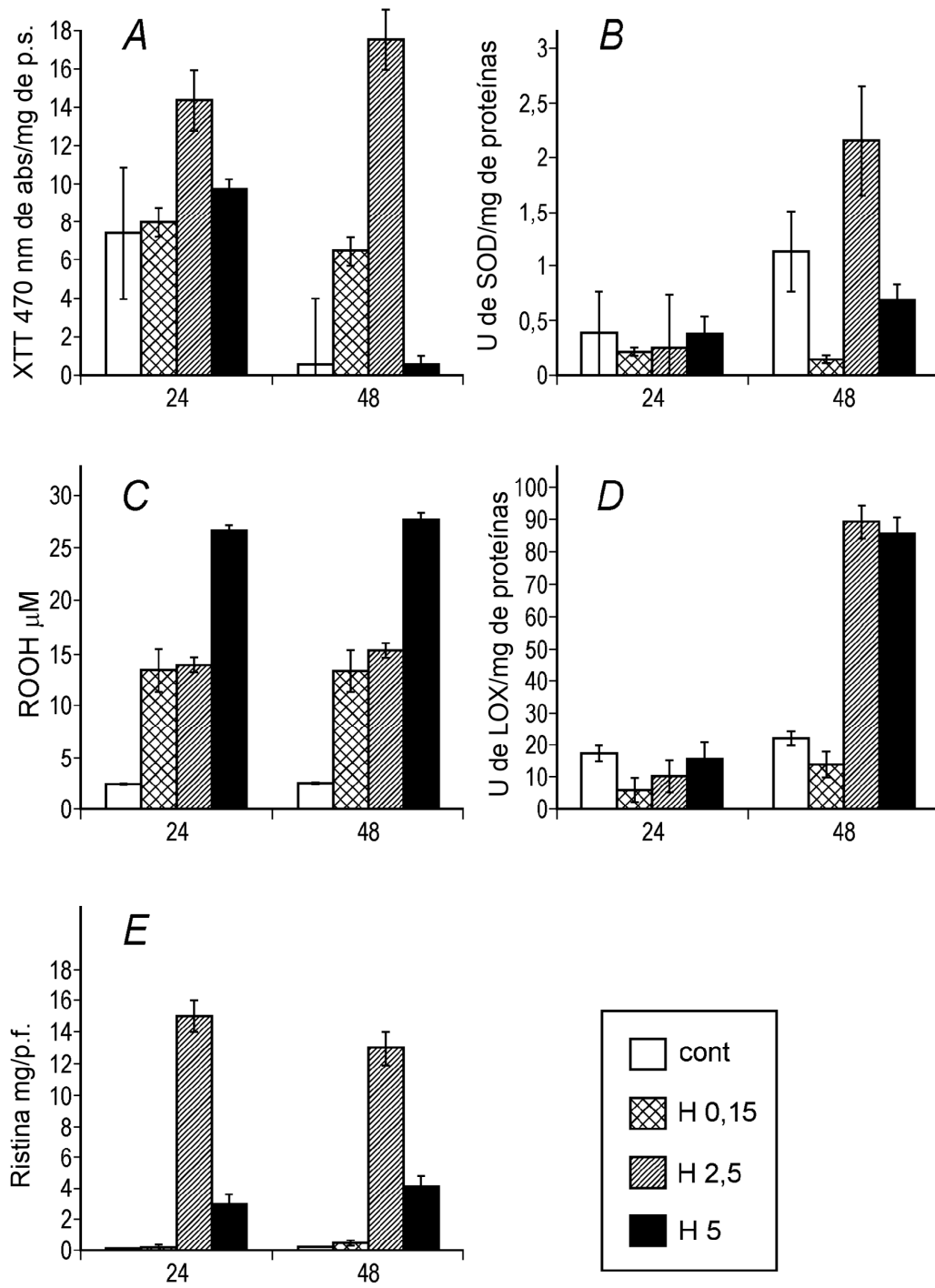


Fig. 6

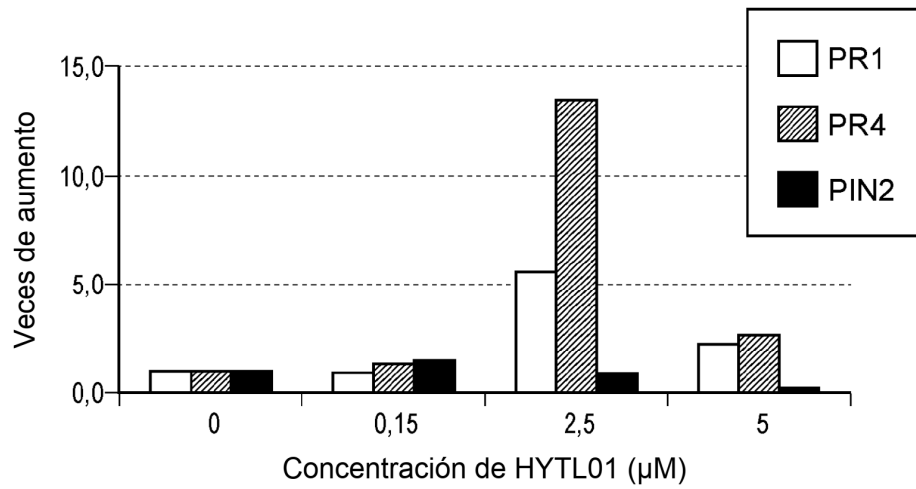


Fig. 7

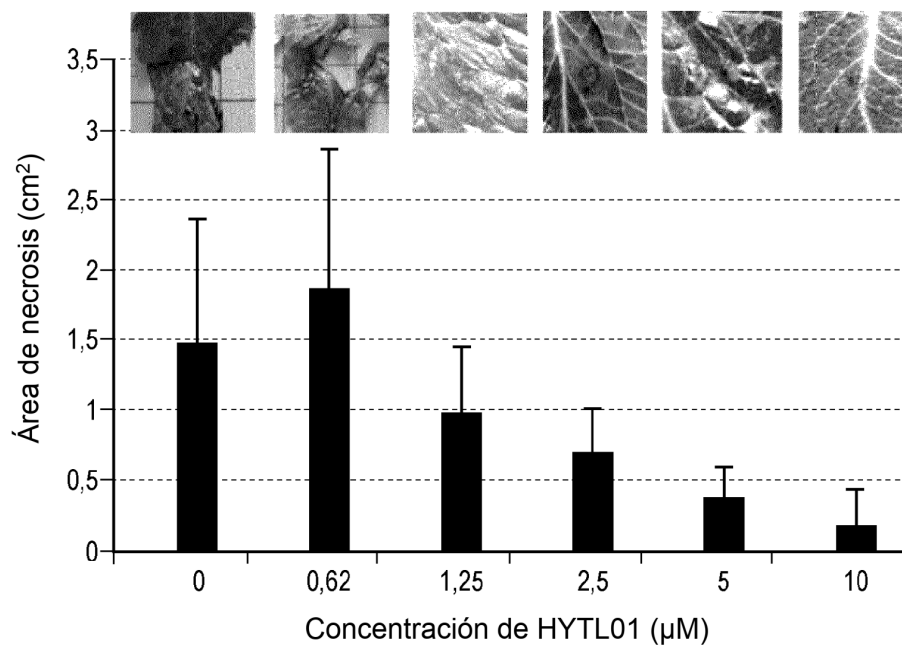


Fig. 8

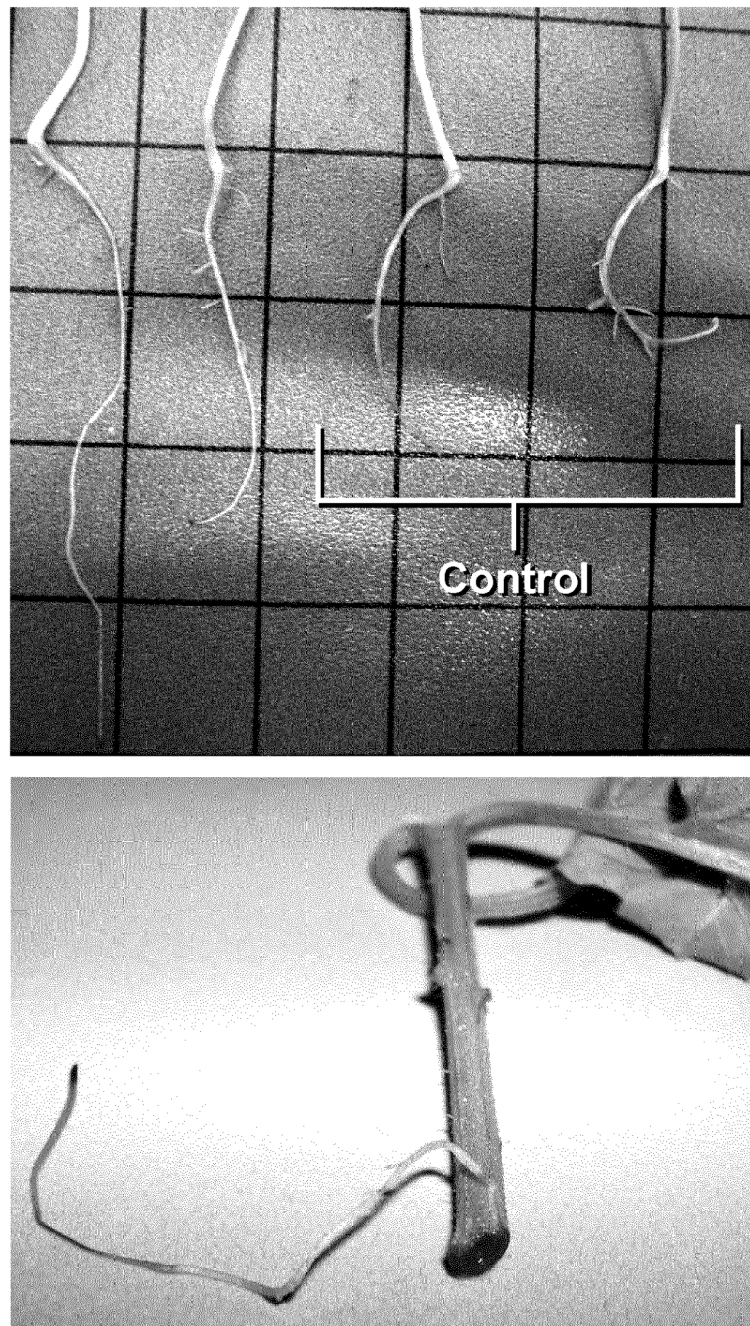


Fig. 9

A	% DE AUM. FRENTE A AGUA	% DE AUM. FRENTE A producto comercial	% DE AUM. FRENTE A T22
Longitud de la raíz	+38,4	+57,3	+23,7
Altura de la planta	+16,5	+43,8	+12,4
Peso fresco de la raíz	+41,1	+12,4	+4,7
Peso fresco del tallo	+30,6	+66,5	+14,3
Peso seco de la raíz	+31,3	+31,3	+28,1
Peso seco del tallo	+18,4	+49,0	+17,3

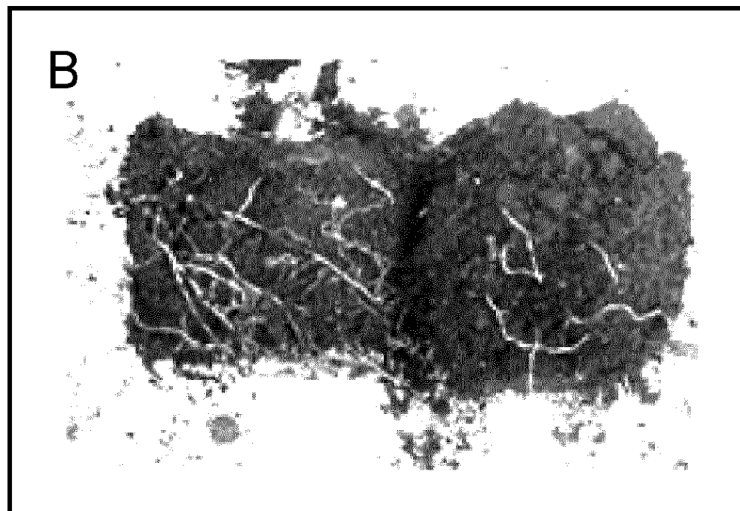


Fig. 10

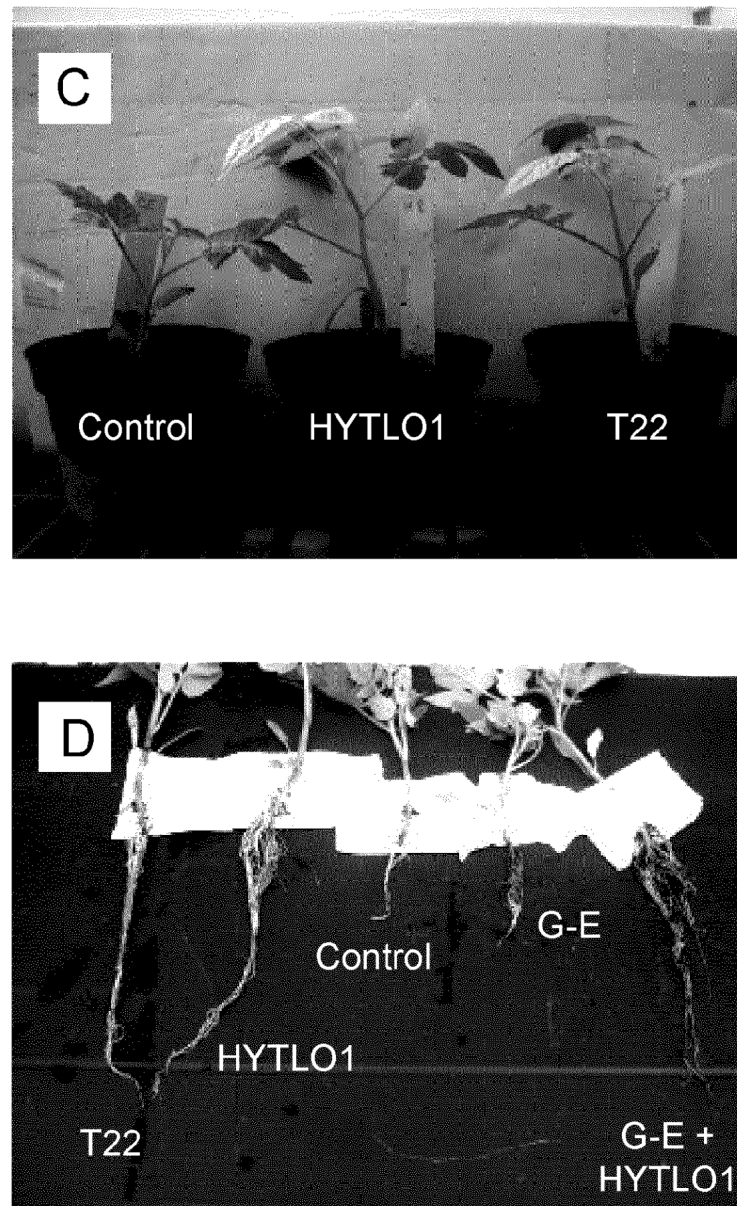


Fig. 10 (continuación)

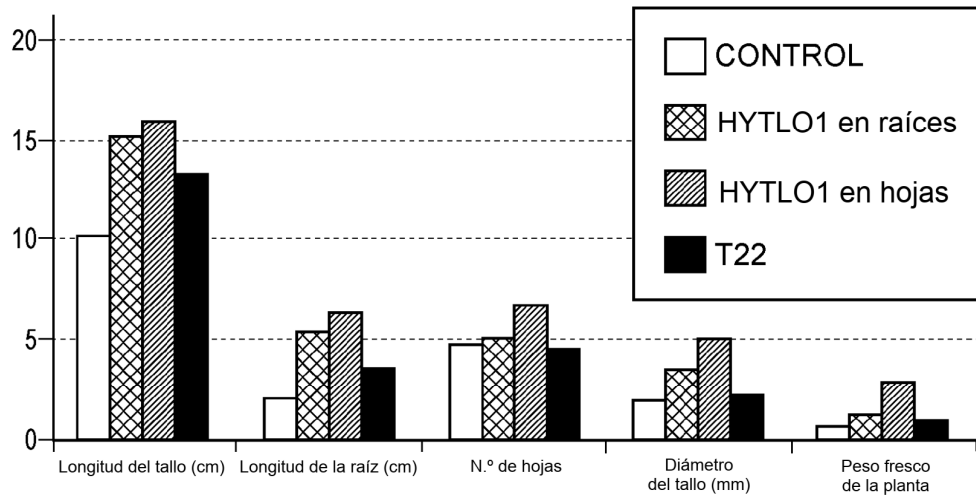


Fig. 11

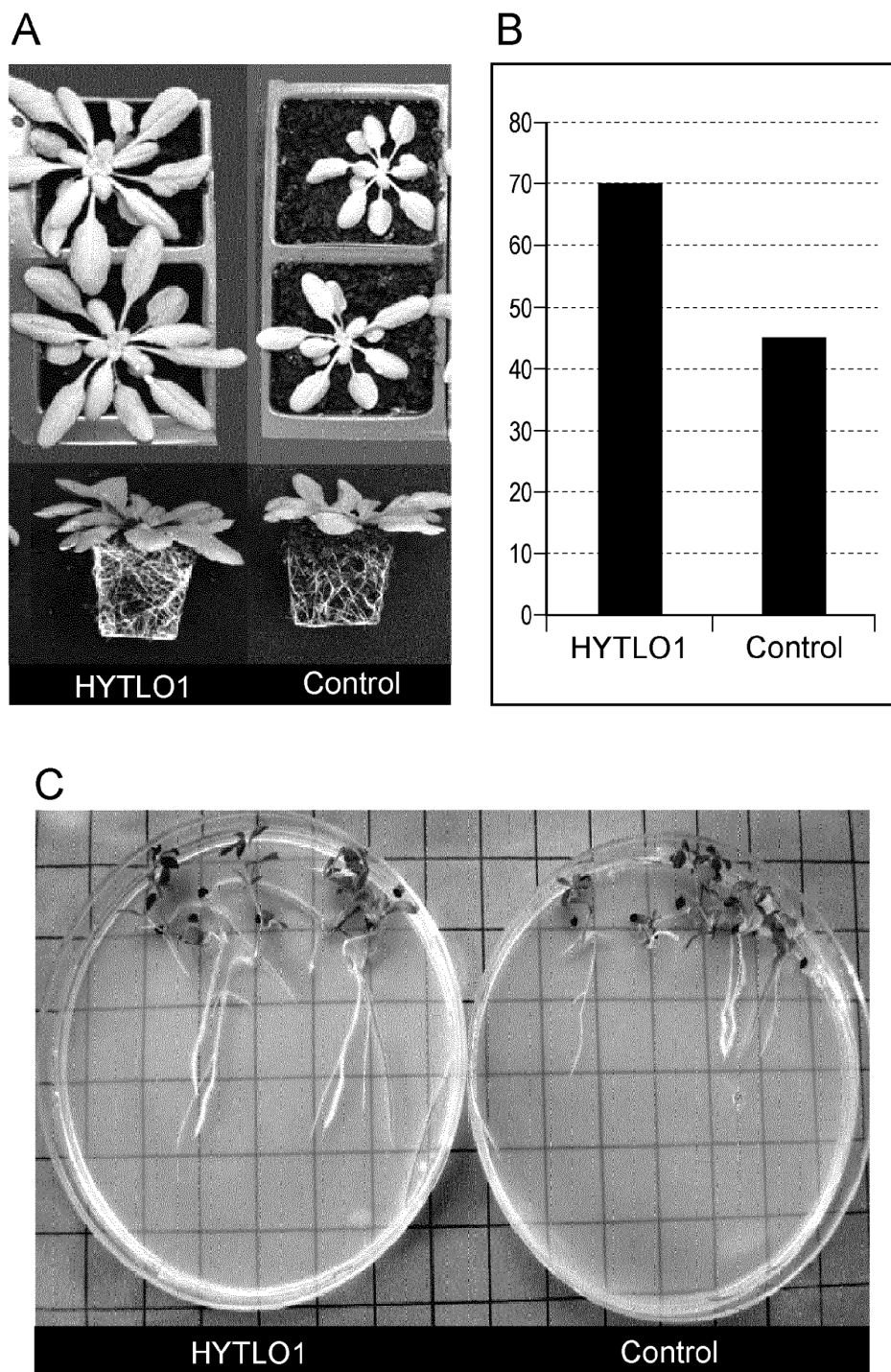


Fig. 12

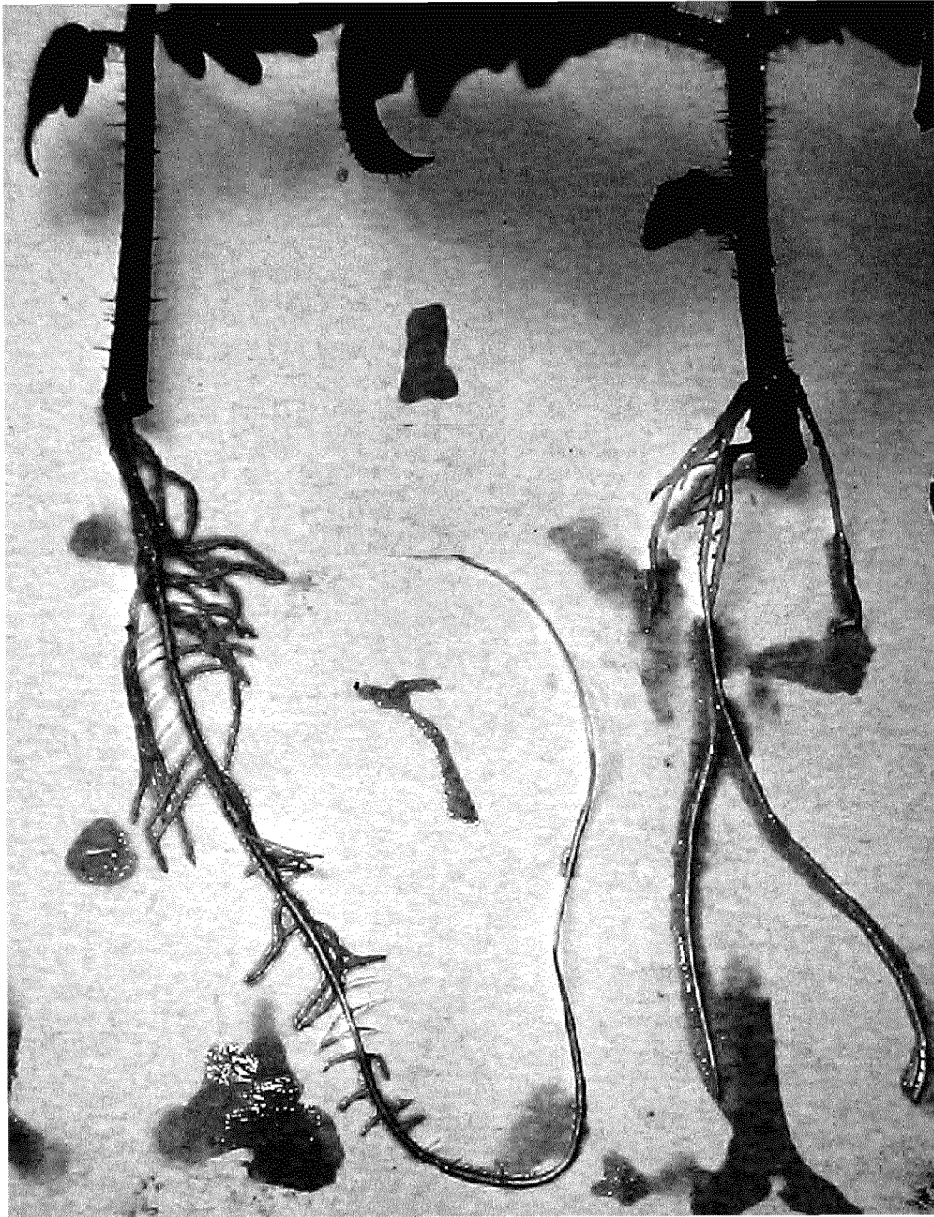


Fig. 13

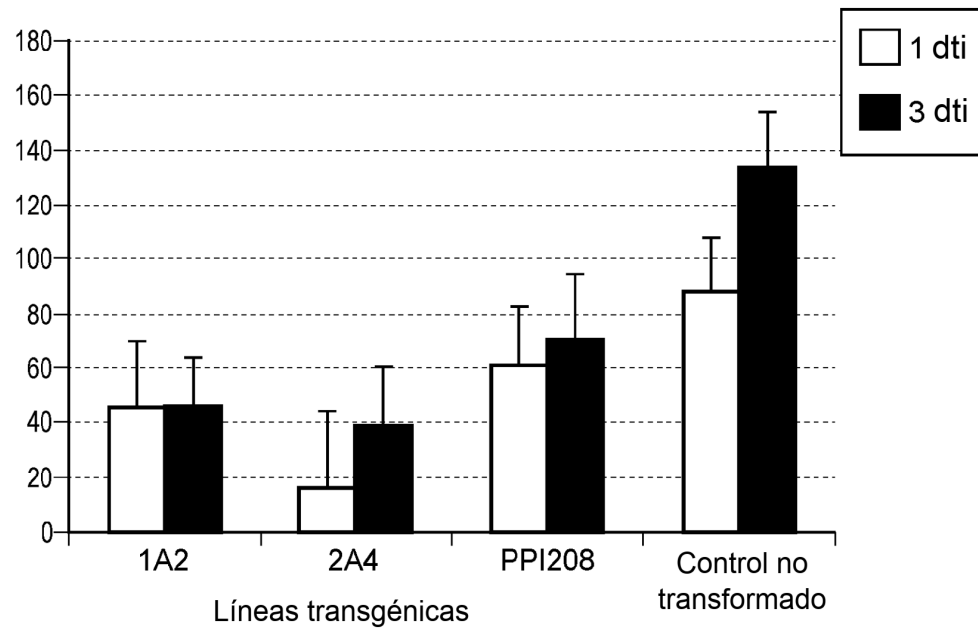


Fig. 14

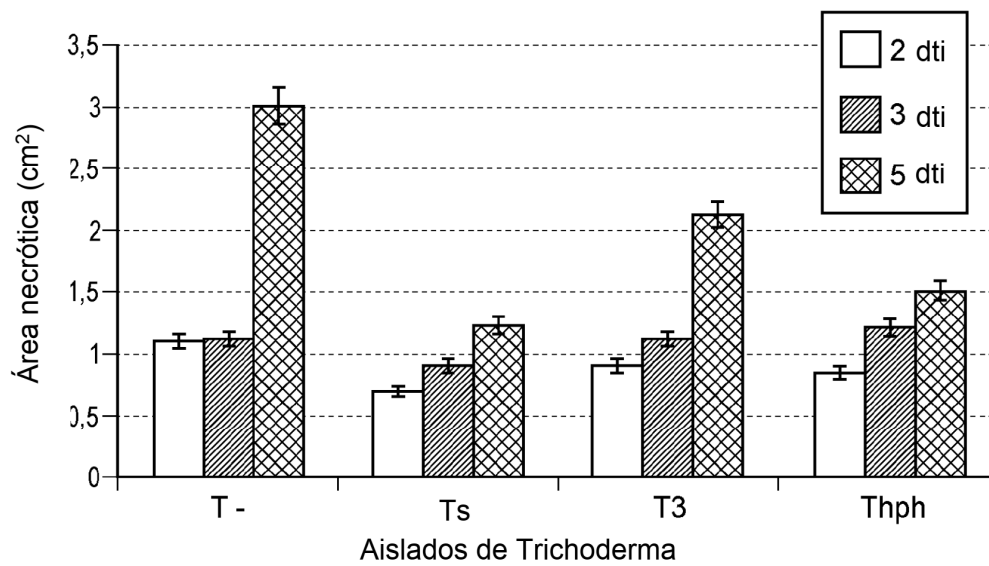


Fig. 15

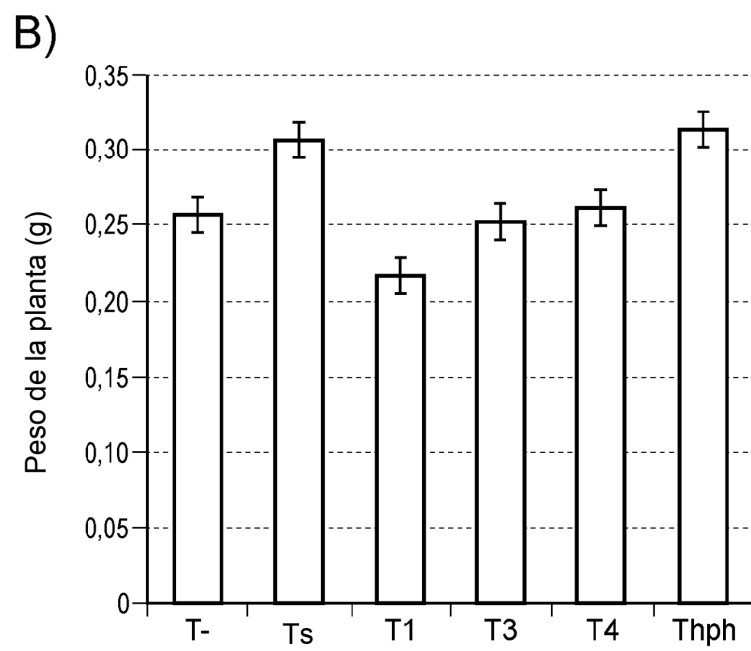
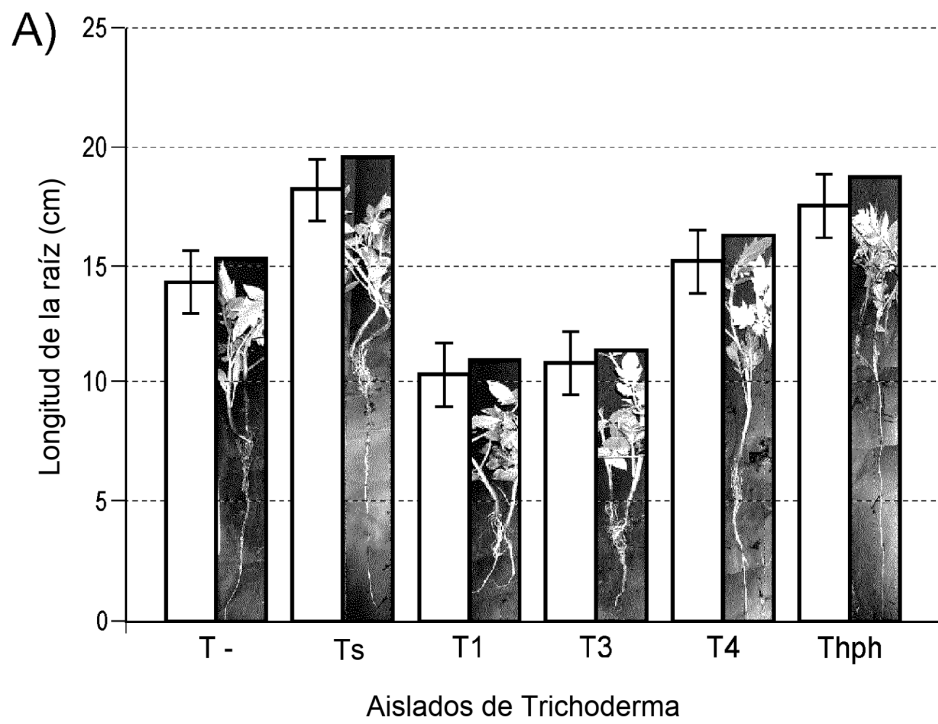


Fig. 16

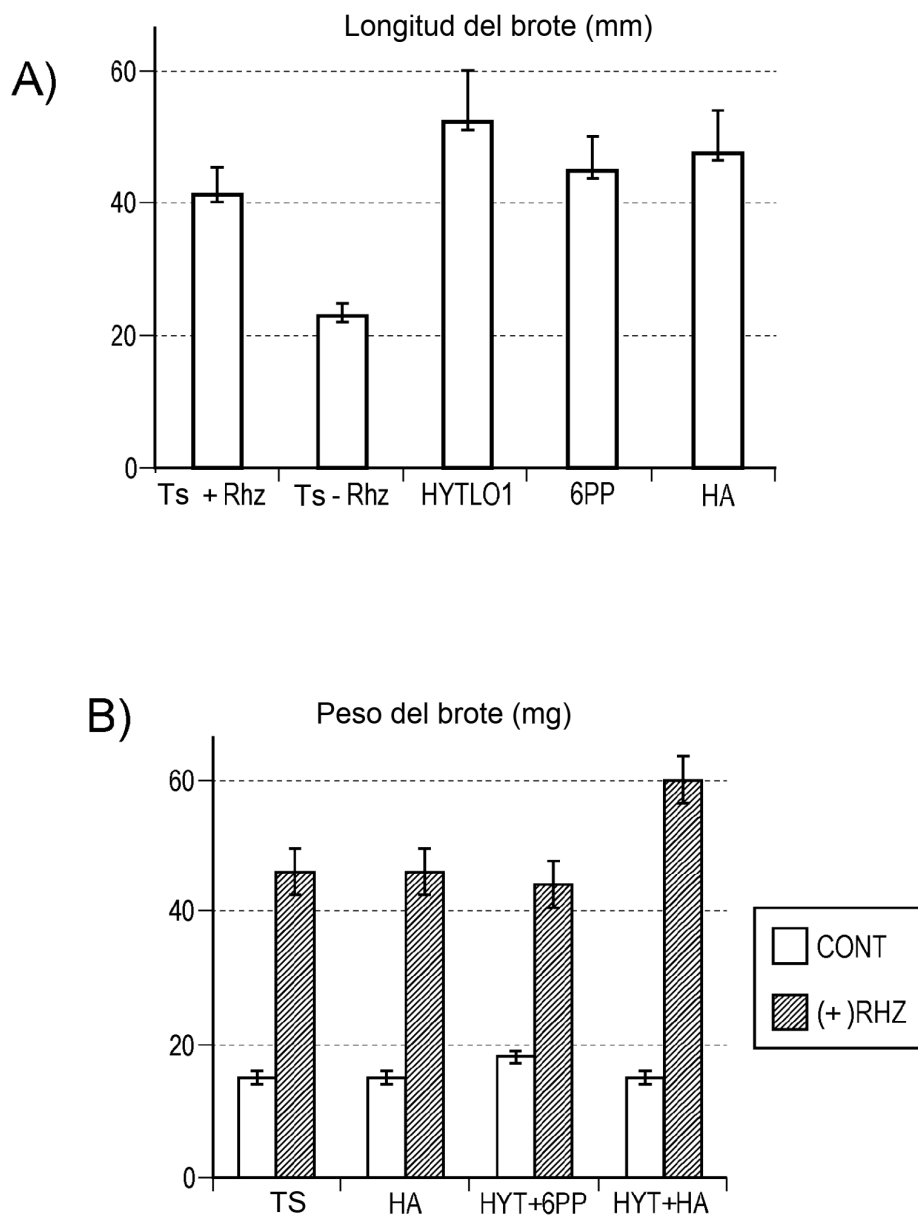


Fig. 17

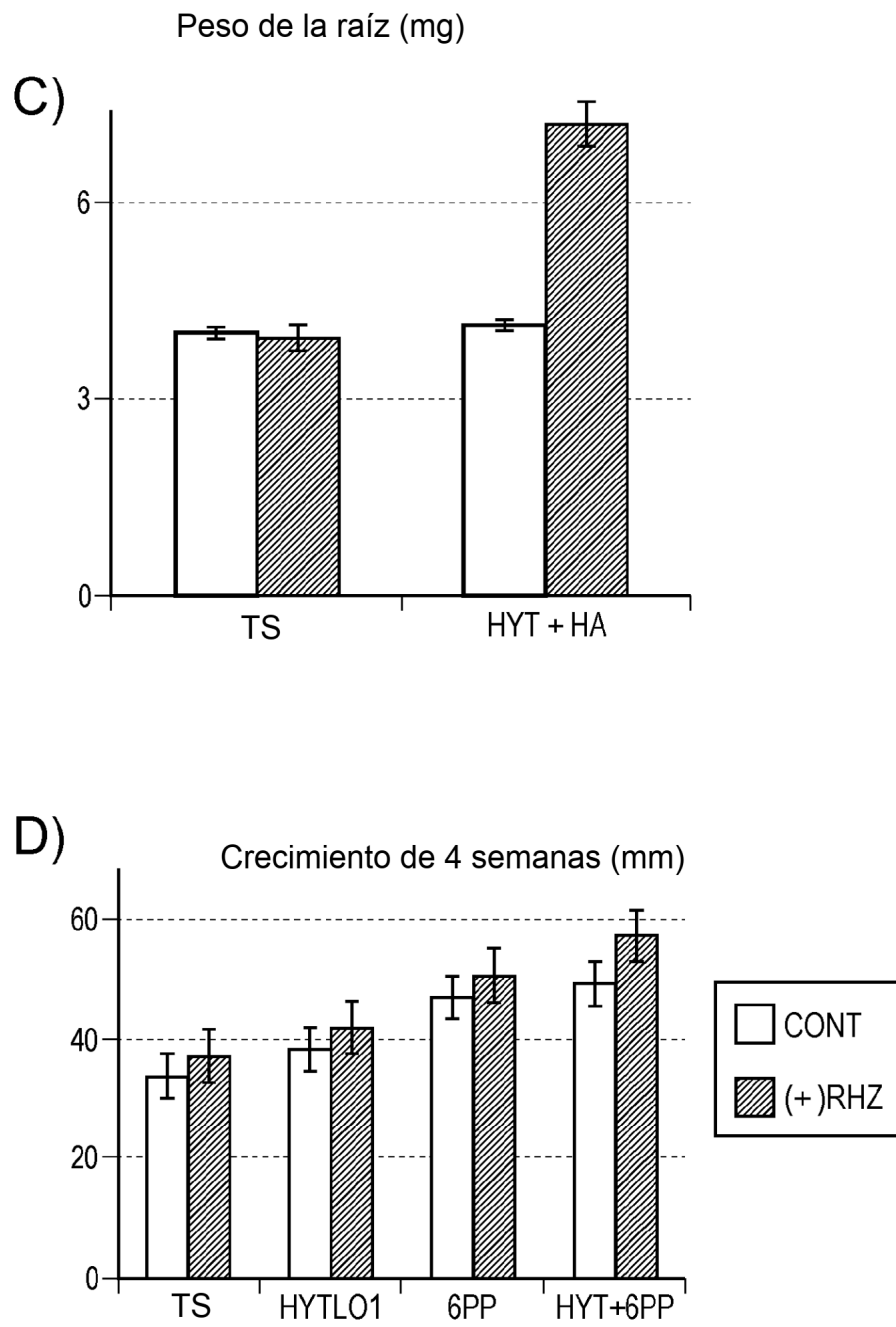


Fig. 17 (continuación)

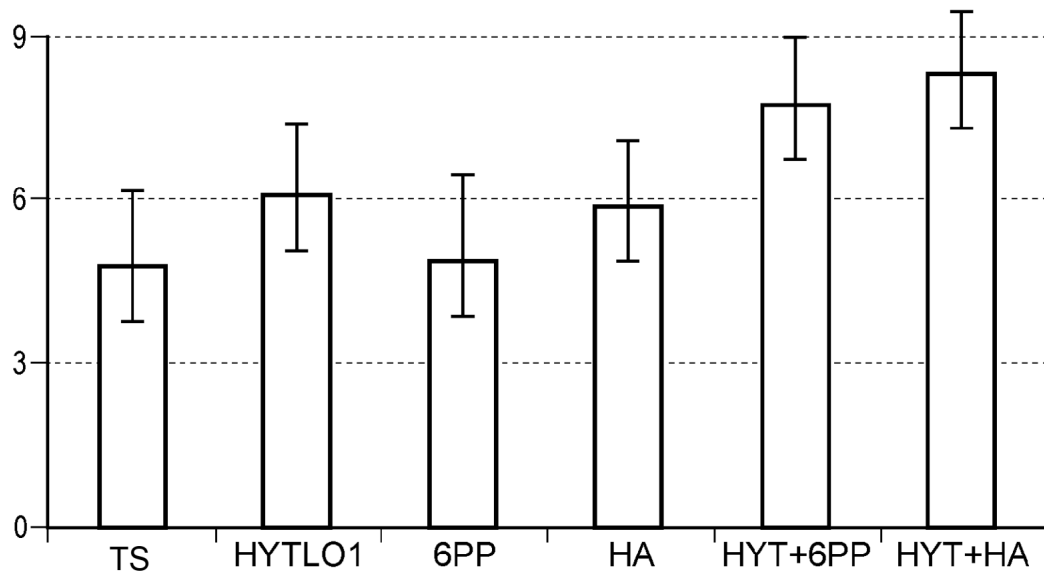


Fig. 18

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **HARMAN et al.** *Plant Disease*, 2010, vol. 94, 928-939 [0002]
- **LORITO et al.** *Phytopathology*, 1993, vol. 83, 313-318 [0003]
- **LORITO et al.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, vol. 9, 206-213 [0003]
- **SANZ et al.** *Current Genetics*, 2004, vol. 46, 277-286 [0003]
- **ZEILINGER et al.** *Fungal Genetics and Biology*, 1999, vol. 26, 131-140 [0003]
- **SCHIRMBOCK et al.** *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, vol. 60, 4364-4370 [0003]
- **VINALE et al.** *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2008, vol. 72, 80-86 [0003]
- **VINALE et al.** *Letters in Applied Microbiology*, 2009, vol. 48, 705-711 [0003]
- **VARGAS et al.** *Plant Physiology*, 2009, vol. 151, 792-808 [0003]
- **YEDIDIA et al.** *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, 1061-70 [0003]
- **WOO et al.** *Phytopathology*, 2006, vol. 96, 181-185 [0003]
- **SHORESH et al.** *Phytopathology*, 2010, vol. 95, 76-84 [0003]
- **HARMAN et al.** *Nature Review Microbiology*, 2004, vol. 2, 43-56 [0003]
- **HANSON ; HOWELL.** *Phytopathology*, 2004, vol. 94, 171-176 [0003]
- **MANDAL; MITRA.** *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2007, vol. 71, 201-209 [0003]
- **SEGARRA et al.** *Proteomics*, 2007, vol. 7, 3943-3952 [0003]
- **PIETERSE et al.** *Plant Cell*, 1996, vol. 8, 1225-1237 [0003]
- **SEGARRA et al.** *Plant Biology*, 2009, vol. 11, 90-96 [0003]
- **AHN et al.** *Molecular Plant Pathogen Interaction*, 2007, vol. 20, 759-768 [0003]
- **CONRATH et al.** *Plant Signalling and Behavior*, 2006, vol. 1, 179-184 [0003]
- **MUKERJEE et al.** *Trichoderma Biology and Application*. Stylus Pub Llc, 2013, 327 [0004]
- **LORITO M. et al.** *Microbiology*, 1994, vol. 140, 623-629 [0010] [0067]
- **SUTHERLAND, M. W. ; B. A. LEARMONTH.** *Free Radical Research*, 1997, vol. 27, 283-289 [0010]
- **CASTORIA, R. et al.** *Phytopathology*, 2003, vol. 93, 564-572 [0010]
- **REVERBERI M et al.** *Free Radical Research*, 2005, vol. 39, 637-647 [0010]
- **BANERJEE D et al.** *Clinica Chimica Acta*, 2003, vol. 337, 147-152 [0010]
- **FANELLI et al.** *Natural Toxins*, 1992, vol. 1, 136-146 [0010]
- **TUCCI M. et al.** *Molecular Plant Pathology*, 2011, vol. 12, 341-354 [0010]
- **WATSON et al.** *Molecular Biology of the Gene*. The Benjamin/Cummings Pub. Co, 1987, 224 [0026]
- **NEEDLEMAN ; WUNSCH.** *Journal of Molecular Biology*, vol. 48, 443-453 [0029]
- **MEYERS ; MILLER.** *Bull. Math. Biol.*, 1989, vol. 51, 5-37 [0031]
- **CHEMICAL ABSTRACTS**, 157148-06-6 [0038]
- **CHEMICAL ABSTRACTS**, 27593-23-3 [0041]
- **BIRGER et al.** *Journal of Chromatography A*, 1999, vol. 865, 129-144 [0050]
- **SCHOCH et al.** *PNAS*, 2012, vol. 109, 6241-6246 [0051]
- **PUNT et al.** *Gene*, 1987, vol. 56, 117-124 [0066]
- **BARBULOVA et al.** *Functional Plant Biology*, 2005, vol. 32, 529-536 [0069]