



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 308 869**

⑫ Número de solicitud: 200501035

⑬ Int. Cl.:
C12N 15/29 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑮ Fecha de presentación: **22.04.2005**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2008**

Fecha de la concesión: **13.10.2010**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
19.08.2010

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **27.10.2010**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
27.10.2010

⑲ Titular/es: **Universidad Politécnica de Valencia**
CTT-Edif. 6G - Camino de Vera, s/n
46022 Valencia, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

⑳ Inventor/es: **Vera Vera, Pablo;**
Coego González, Alberto;
Ramírez García, Vicente y
Gil Morrió, María José

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Gen OCP3 de *Arabidopsis thaliana* y su mutación recesiva *ocp3*, y su uso como regulador de la resistencia en plantas a enfermedades producidas por patógenos fúngicos necrotróficos.**

㉓ Resumen:

Gen *OCP3* de *Arabidopsis thaliana* y su mutación recesiva *ocp3*, y su uso como regulador de la resistencia en plantas a enfermedades producidas por patógenos fúngicos necrotróficos.

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la biotecnología vegetal, y en concreto se refiere al gen *OCP3* de *Arabidopsis* y su mutación *ocp3*, así como su función en la regulación de la resistencia a enfermedades producidas por patógenos necrotróficos, y sus aplicaciones en la generación de plantas transgénicas resistentes a este tipo de patógenos.

ES 2 308 869 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Gen *OCP3* de *Arabidopsis thaliana* y su mutación recesiva *ocp3*, y su uso como regulador de la resistencia en plantas a enfermedades producidas por patógenos fúngicos necrotróficos.

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la biotecnología vegetal, y en concreto se refiere al gen *OCP3* de *Arabidopsis* y su mutación *ocp3*, así como su función en la regulación de la resistencia a enfermedades producidas por patógenos necrotróficos, y sus aplicaciones en la generación de plantas transgénicas resistentes a este tipo de patógenos.

Estado de la técnica

Las plantas reaccionan al ataque por microorganismos fitopatógenos con una serie de respuestas inducibles que conducen a la expresión local y sistémica de un amplio espectro de defensas antimicrobianas. Estas incluyen el fortalecimiento de barreras mecánicas, estallido oxidativo, producción de novo de compuestos antimicrobianos y la inducción del mecanismo de respuesta hipersensible (HR), donde el tejido que rodea al sitio de infección muere y a su vez limita el crecimiento del patógeno impidiendo su extensión (*Hammond-Kosack y Parker, (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Curr. Op. Biotechnol. 14, 177-193.*

Nuestra comprensión de cómo las plantas activan las respuestas de defensa se ha desarrollado substancialmente, y esto en parte se ha facilitado por la clonación y caracterización de factores de resistencia a enfermedades de las plantas que reconocen los factores avirulentos correspondientes del patógeno para inducir la respuesta hipersensible o HR (*Dangl y Jones, (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411, 826-33.*

La inducción de la respuesta hipersensible a menudo está asociada con el desarrollo de resistencia sistémica adquirida (SAR), otra respuesta de defensa bien estudiada que proporciona una protección duradera en toda la planta contra un amplio espectro de patógenos (*Durrant y Dong, (2004) Systemic acquired resistance. Ann. Rev. Phytopathol. 42, 185-209.*

El aislamiento y análisis de mutantes con respuestas de defensa alteradas (*Durrant y Dong, 2004; Kunkel y Brooks, (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Curr. Op. Plant Biol. 5, 325-331*) están ayudando a la caracterización de componentes celulares implicados en la transducción de señales y a la comprensión del papel de las moléculas señal de defensa de las plantas. Estos estudios tienen una importancia primordial para comprender el acoplamiento de reconocimiento de patógenos a la activación de respuestas de defensa en la planta. El ácido salicílico (SA), un derivado de ácido benzoico, es una molécula señal central que media diferentes aspectos de las respuestas HR y SAR. Desde hace mucho tiempo se ha demostrado que la síntesis y acumulación del ácido salicílico es indispensable para crear una respuesta de defensa eficaz contra oomicetes y patógenos bacterianos (*Gaffney, T., Friedrich, L., Ver-nooij, B., Negretto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for induction of systemic acquired resistance. Science 261, 754-756.*) y su señalización está mediada en su mayor parte por una proteína de repetición de anquirina, NPR1/NIM1 (*Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. Cell 88, 57-63*) aunque, se han propuesto y se han identificado genéticamente rutas independientes de NPR1 para canalizar la señalización por ácido salicílico (*Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., and Dong, X (1998). Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: Characterization of the dominant Arabidopsis cpr6-1 mutant. Plant Cell 10, 557-569; Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M., and Dong, X (2000). Roles of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, and Ethylene in cpr-Induced Resistance in Arabidopsis. Plant Cell 12, 2175-2190; Mayda, E., Mauch-Mani, B., and Vera, P. (2000). The Arabidopsis dth9 mutant is compromised in systemic acquired resistance without affecting SA-dependent responses. Plant Cell 12, 2119-2128; Shah, J., Kachroo, P., and Klessig, D.F. (1999). The Arabidopsis ss1 mutation restores pathogenesis-related gene expression in npr1 plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. Plant Cell 11, 191-206.*

Además del ácido salicílico, se ha demostrado que otras moléculas de señalización tales como el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET), solos o en combinación concertada, regulan otros aspectos distintos de las respuestas de defensa de las plantas (*Kunkel y Brooks, 2002; Turner, J.G., Ellis, C., and Devoto, A. (2002). The jasmonate signal pathway. Plant Cell (suppl), S153-S164.*), y también se han proporcionado indicios genéticos de esta implicación en la respuesta a patógenos fúngicos. Por ejemplo, ciertos mutantes de *Arabidopsis* que no pueden producir ácido jasmónico (por ejemplo, un mutante triple *fad3 fad7 fad8*), o que no pueden percibir esta hormona (por ejemplo, *coi1*, *jin1* o *jar1/jin4*) tuvieron una susceptibilidad alterada a diferentes patógenos necrotróficos (*Kunkel y Brooks, 2002; Lorenzo O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J., Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defence Responses in Arabidopsis. Plant Cell 16, 1938-1950; Staswick, P.E., Yuen, G.Y., and Lehman, C. C. (1998). Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus Pythium irregulare. Plant J. 15, 747-54; Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K. Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A. and Broekaert, W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 15107-11; Thomma, B.P., Penninckx, L.A., Broekaert, W.F., and Cammue, B.P. (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. Curr Opin Immunol. 13, 63-68; Vijayan P, Shockey J, Levesque CA, Cook RJ, Browse J. (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 7209-7214).*

Además, durante la respuesta de resistencia a enfermedades, se ha descrito una relación antagonista mutua entre las rutas de señalización por ácido salicílico y ácido jasmónico (Kunkel y Brooks, 2002). A este respecto, los mutantes de *Arabidopsis* con deficiencias en la acumulación de ácido salicílico (SA) (por ejemplo, pad4 y eds1) o con una alteración en la respuesta al ácido salicílico (por ejemplo, npr1) presentan una mejor inducción de genes que responden al ácido jasmónico (JA) (Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M., Broekaert, W.F. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8, 2309-23; Clarke et al., 1998; Gupta, V, Willits, M G., and Glazebrook, J. (2000). *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 503-511).

Se ha postulado que la supresión normal de los genes de respuesta a JA por SA se regula por la diferente localización celular de la proteína NPR1 (Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X, and Pieterse, C.M.J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15; 760-770).

De forma similar, ciertos estudios genéticos proporcionan indicios que indican que la señalización con JA también puede controlar negativamente la expresión de genes que responden a SA en *Arabidopsis* (Petersen, M, Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., and Mundy J. (2000). *Arabidopsis* MAP Kinase 4 Negatively Regulates Systemic Acquired Resistance. *Cell* 103, 1111-1120; Kloek et al., 2001; Li, J., Brader, G., and Palva, E.T. (2004). The WRKY70 Transcription Factor: A Node of Convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated Signals in Plant Defense. *Plant Cell* 16, 319-333).

El mecanismo molecular que explica tal réplica de ruta sigue sin entenderse bien. Por lo tanto, la caracterización de componentes moleculares que finalmente coordinan las rutas de señalización por SA y JA es primordial para la comprensión, y finalmente la creación por ingeniería genética, de mecanismos de resistencia muy regulados que proporcionan una protección eficaz a subseries específicas de patógenos. Además de las moléculas señal mencionadas anteriormente, desde hace mucho tiempo se ha reconocido la producción y acumulación de especies oxígeno reactivas (ROS), principalmente superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), durante el curso de una interacción planta-patógeno (Apostol, I., Heinsteins, F.H., Low, P.S. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* 90, 109-116.; Baker, C.J., and Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen species in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 299-321).

Los indicios sugieren que el estallido oxidativo y la señalización redox afín asociada posteriormente, pueden jugar un papel central en la integración de una diversa serie de respuestas de defensa de las plantas (Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PI, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773-784; Grant, J.J., and Loake, G. J. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124, 21-29). Además, también se ha documentado en plantas, una réplica entre respuestas de defensa dependientes de ROS y SA (Kauss, H., Jeblick, W. (1995). Pretreatment of Parsley Suspension Cultures with Salicylic Acid Enhances Spontaneous and Elicited Production of H_2O_2 . *Plant Physiol.* 108, 1171-1178.; Mur, L.A., Brown, I.R., Darby, R.M., Bestwick, C.S., Bi, Y.M., Mansfield, J. W, Draper, J. (2000). A loss of resistance to avirulent bacterial pathogens in tobacco is associated with the attenuation of a salicylic acid potentiated oxidative burst. *Plant J.* 23, 609-621; Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K, Dixon, R.A., and Lamb, C. (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell.* 9, 261-70; Tierens, K.F., Thomma, B.P., Bari, R.P., Garmier, M, Eggermont, K., Brouwer, M, Penninckx, LA., Broekaert, W.F., and Cammue, B.P. (2002). *Esa1*, an *Arabidopsis* mutant with enhanced susceptibility to a range of necrotrophic fungal pathogens, shows a distorted induction of defense responses by reactive oxygen generating compounds. *Plant J.* 29, 131-40), pero sigue sin entenderse bien el mecanismo exacto y los componentes que asocian una señalización redox con la respuesta de defensa inducida.

Recientemente, se ha identificado el gen *Ep5C* de plantas de tomate, que codifica una peroxidasa catiónica, y se ha usado como marcador para respuestas tempranas dependientes de la transcripción, controladas por H_2O después de la percepción de un patógeno, y con un modo de activación génica conservado tanto en tomate como en plantas *Arabidopsis* (Coego, A., Ramirez, V., Ellul, P., Mayda, E., and Vera, P. (2005). The H_2O_2 -regulated *Ep5C* gene encodes a peroxidase required for bacterial speck susceptibility in tomato. *Plant J.* "in press"). Como la expresión inducida por patógenos de *Ep5C* se basa en la producción y acumulación de H_2O_2 por la célula vegetal afectada, esto apunta a *Ep5C* como marcador para buscar nuevos componentes de defensa que finalmente participan en las rutas relacionadas con la defensa en las plantas. Para este fin, en la presente invención se describe el aislamiento y caracterización del mutante *ocp3* de *Arabidopsis thaliana* desregulado en la expresión del gen *Ep5C* inducible por H_2O_2 identificado previamente. Se demuestra que OCP3 codifica un factor de transcripción de tipo homeobox que regula diferentes aspectos de la respuesta de defensa. Por medio del análisis de plantas mutantes *ocp3* y el análisis de epistasis con otros mutantes relacionados con la defensa, se propone que OCP3 controla aspectos críticos de la ruta mediada por JA en patógenos necrotróficos.

Descripción de la invención

Aislamiento y caracterización del mutante ocp3 de Arabidopsis

5 Tal y como se ha comentado anteriormente, el gen *Ep5C* codifica una peroxidasa catiónica extracelular y se activa transcripcionalmente por el H_2O_2 generado durante el curso de interacciones planta-patógeno (Coego *et al.*, 2005). Para identificar señales y mecanismos implicados en la inducción del gen *Ep5C* y probar el impacto que puede tener esta ruta en la resistencia a enfermedades, se realizó una búsqueda de mutantes usando plantas transgénicas de *Arabidopsis* que llevan una construcción génica *Ep5C-GUS* (el gen GUS codifica para la enzima β -Glucoronidasa). La base lógica de la presente investigación fue que buscando mutantes que mostraran una expresión constitutiva del gen indicador en plantas cultivadas en condiciones no inductivas, se identificarían mutaciones que afectan a la regulación de esta ruta de-señalización. Por lo tanto, se mutagenizó una de nuestras líneas transgénicas de *Arabidopsis Ep5C-GUS*, previamente caracterizada con metanosulfonato de etilo (EMS) y se usaron plantas M2 (segunda generación de un mutantes inducido, en el presente caso por agentes químicos o físicos) para determinar la existencia de cualquier expresador constitutivo de GUS en ausencia de cualquier amenaza por patógenos. De aproximadamente 10.000 plantas M2 investigadas, se identificaron 18 expresadores constitutivos de GUS que se dejó que produjeran semillas. La actividad GUS se ensayó de nuevo en la descendencia de todos estos supuestos mutantes para confirmar si el fenotipo era heredable. Ocho líneas, correspondientes a seis grupos de complementación mantuvieron la actividad constitutiva GUS en generaciones posteriores. Se denominó a estos mutantes ocp (del inglés Overexpression of Cationic Peroxidase gene promoter) y el mutante seleccionado para el análisis adicional fue ocp3 (figura 1). Macroscópicamente, las plantas *ocp3* no fueron muy distintas de las plantas de tipo silvestre tanto en términos de la arquitectura de la planta como en términos del hábito de crecimiento (figura 1A). Sin embargo, en fases tempranas del desarrollo de las plantas, las plantas *ocp3* muestran un retraso en la velocidad de crecimiento en comparación con las plantas de tipo silvestre. Este retraso en la velocidad de crecimiento también va acompañado de la presencia de un color verde menos intenso en las hojas jóvenes. Se realizó una tinción histoquímica para investigar el modelo de expresión del gen indicador constitutivo en los mutantes *ocp3* en comparación con las plantas parentales de tipo silvestre no mutagenizadas. Como se muestra en la figura 1B, en las plántulas parentales no se detectó actividad GUS excepto en una zona discreta en la unión entre la raíz y el tallo (véase la flecha del panel izquierdo de la figura 1B). Al contrario, en las plántulas *ocp3* se detectó actividad GUS en las hojas en expansión así como en los cotiledones y en el tallo, pero se detectó muy poca actividad en las raíces. De la misma manera, en las hojas en roseta de las plantas *ocp3*, la actividad GUS se distribuyó a lo largo de todo el haz de la hoja, mientras que las hojas de las plantas parentales no mostraron una expresión de GUS detectable (figura 1C).

Como se propuso que el H_2O_2 era la molécula señal que desencadenaba la activación de la transcripción de *Ep5C* después de la percepción del patógeno (Coego *et al.*, 2005), se hipotetizó que la acumulación de H_2O_2 aumenta en plantas *ocp3* o, como alternativa, el mutante *ocp3* debe ser hipersensible a ROS. Para examinar si las plantas *ocp3* mostraban algún fenotipo en relación con esto, se estudió la sensibilidad al H_2O_2 o a reactivos que generan directa o indirectamente H_2O_2 . Se dejaron germinar semillas de *ocp3* y de la línea parental en medio MS (Murashige y Skoog) que contenía diferentes cantidades de H_2O_2 y el crecimiento se registró a diferentes intervalos de tiempo. No se encontraron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento para *ocp3* con respecto a las plántulas parentales. De manera similar, la inhibición del crecimiento fue parecido en las plántulas de tipo silvestre y *ocp3* cuando se ensayó con luz en presencia de las moléculas generadoras de ROS, con rosa de bengala (4,5,6,7-tetracloro-2',4',5',7'-tetrayodofluoresceína) o paraquat (metil viologen). De esta manera, según estos ensayos, la mutación *ocp3* no confiere un aumento de sensibilidad o una mayor resistencia al estrés oxidativo. Sin embargo, el análisis de transferencia de Northern con ARNm de plantas de tipo silvestre y plantas *ocp3* reveló (figura 1F; calles de la derecha) que las plántulas mutantes expresaban constitutivamente *GST6*, un gen que como se había demostrado previamente se controlaba por H_2O_2 (Alvarez *et al.*, 1998; Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. (1994). *H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell* 79, 583-93.). Esto refleja que las plantas *ocp3* pueden estar produciendo y/o acumulando mayores niveles de H_2O_2 que los encontrados normalmente en las plantas de tipo silvestre. Para ensayar esto, se tiñeron hojas *in situ* con 3,3'-diaminobencidina (DAB), un reactivo histoquímico que en presencia de H_2O_2 , se polimeriza para producir un precipitado pardo-rojizo visible (Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., and Collinge, D.B. (1997). *Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. Plant J.* 11, 1187-1194.). En las hojas de las plantas de tipo silvestre pudo observarse muy poca tinción con DAB (figura 1D, izquierda). Al contrario, las hojas de plantas *ocp3* mostraron distintos focos de tinción con DAB esparcidos a lo largo de todo el haz de la hoja (figura 1D, a la derecha). Además, las plantas *ocp3* no mostraron ningún signo de muerte celular o colapso celular, como se reveló después de la tinción con azul tripano (figura 1E) y no mostró diferencias con el tipo silvestre cuando se ensayó la producción de aniones superóxido (O_2^-) por tinción con nitroazul de tetrazolio.

De esta manera, la mayor acumulación observada de H_2O_2 y la inducción de *GST6* en plantas *ocp3*, sugiere que la mutación produce una señal relacionada con el estrés oxidativo, pero no induce una respuesta de muerte celular. Esto concuerda con la observación previa en la que el H_2O_2 , cuando se genera durante una interacción de planta-patógeno o cuando se genera *in situ* por infiltración con diferentes sistemas de generación de H_2O_2 , es la señal que desencadena la activación de la transcripción de *Ep5C-GUS*, característica en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Coego *et al.*, 2005). Por lo tanto, en el mutante *ocp3* concurren tanto la generación de H_2O_2 como la activación del mecanismo de señalización que conduce a la activación de la transcripción de *Ep5C*.

El mutante ocp3 tiene una mayor resistencia a patógenos necrotróficos, pero no a patógenos biotróficos

Para estudiar una relación causal entre la ruta de señalización que media la activación de *Ep5C-GUS* en *ocp3*, y la que media la susceptibilidad a enfermedades, se ensayó la respuesta de este mutante a diferentes patógenos que generan enfermedades en *Arabidopsis*. En la figura 2 se muestra la respuesta de plantas *ocp3* al oomicete biótrofo virulento obligado *Peronospora parasitica* y su comparación con la respuesta de plantas parentales de tipo silvestre. El crecimiento del patógeno se ensayó por observación directa de hifas teñidas en hojas infectadas (figura 2A) y por el recuento de las esporas producidas en las hojas infectadas (figuras 2B). Usando estas dos medidas, no hubo ninguna diferencia significativa en el crecimiento de patógenos entre las plantas de tipo silvestre y las plantas *ocp3*. Se produjo esporulación en el 50% de las hojas tanto de plantas de tipo silvestre como de plantas *ocp3*. Por lo tanto, la mutación *ocp3* no afecta a la susceptibilidad de la planta a la colonización por *P. parasitica*.

Se investigaron adicionalmente los cambios en la susceptibilidad de plantas *ocp3* a patógenos, usando el patógeno bacteriano virulento *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) y controlando la velocidad de crecimiento de esta bacteria en las hojas inoculadas. Las curvas de crecimiento resultantes se muestran en la figura 2C. Como ocurre con *P. parasitica*, la velocidad de crecimiento de *Pst* DC3000 en plantas *ocp3* no fue significativamente diferente de la observada en las plantas de tipo silvestre. Por lo tanto, la susceptibilidad de la planta de tipo silvestre y del mutante *ocp3* también sigue casi intacta tras la inoculación local con este patógeno.

Para determinar si la mutación *ocp3* podría provocar cambios en la susceptibilidad a patógenos necrotróficos, se inocularon plantas con *Botrytis cinerea*. La enfermedad se evaluó entre 5 y 10 días después de la inoculación siguiendo el grado de necrosis y la muerte que aparecía en las hojas inoculadas. Como era de esperar, las plantas de tipo silvestre eran muy susceptibles a *Botrytis*, y todas las plantas inoculadas mostraron necrosis acompañada de una proliferación extensiva del micelio fúngico (figura 2F-G). Sin embargo, y en un marcado contraste, ninguna de las plantas *ocp3* que se inocularon con los mismos hongos mostraron una necrosis extendida en las hojas inoculadas (figura 2F-G). Además, en plantas *ocp3* se inhibió drásticamente la proliferación del micelio fúngico. Esto indica que la resistencia a este patógeno necrotrófico en el mutante *ocp3* estaba espectacularmente potenciada, o la susceptibilidad bloqueada.

Para ensayar si la susceptibilidad alterada a las enfermedades de *ocp3* es específica para *Botrytis*, se expusieron a las plantas a *Plectosphaerella cucumerina*, otro necrótrofo. La infección de las plantas de tipo silvestre con *P. cucumerina* también condujo a una fuerte degradación del tejido de la hoja, manifestado como lesiones extendidas y clorosis que aumenta en diámetro según progresa la infección a lo largo de la hoja inoculada (figura 2D). Al contrario, las plantas *ocp3* mostraron un alto grado de resistencia a este patógeno fúngico, ya que se redujo drásticamente la necrosis visible y medible de las hojas inoculadas (figura 2D-E), y también se inhibió drásticamente la proliferación del micelio fúngico.

Basándose en estos resultados, puede concluirse que la susceptibilidad a hongos necrotróficos es un rasgo característico asociado con el locus *OCP3*, y la mutación identificada en este locus produce una mayor resistencia a los mismos patógenos. Esta consideración también concuerda con la observación de que *PDF1.2*, un gen marcador cuya expresión es inducible para la ruta de defensa de respuesta a ET/JA contra patógenos fúngicos necrotróficos (Turner *et al.*, 2002), se expresa constitutivamente en plantas *ocp3* (figura 1F).

La mayor resistencia de plantas ocp3 a hongos necrotróficos requiere ácido jasmónico (JA) pero no ácido salicílico (SA) o etileno (ET)

La expresión constitutiva en plantas *ocp3* del gen *GST6* inducible por H_2O_2 y el *PDF1.2* por JA, pero no del gen *PR-1* inducible por SA, (figura 1F), sugiere una asociación entre el estrés oxidativo y la señalización con JA, que aparentemente es independiente de SA. En la compleja trama de interacciones que tienen lugar durante las respuestas de resistencia de las plantas, desde hace mucho tiempo se ha documentado una relación antagonista entre la ruta de SA y JA/ET (Kunkel y Brooks, 2002) e indica que en plantas *ocp3*, la activación constitutiva de la ruta que conduce a la expresión del gen *PDF1.2* podría ser la negación de la expresión de genes dependientes de SA. Sin embargo, la aplicación exógena de SA promueve la expresión del gen marcador *PR-1* tanto en plantas *ocp3* como en plantas de tipo silvestre (figura 1F), indicando que las plantas *ocp3* no están afectadas en la percepción de SA, y coincide con la observación de que la respuesta de resistencia a patógenos biotróficos también está intacta en este mutante (figura 2A-C). Además, la aplicación exógena de SA anula la expresión constitutiva de *PDF1.2* que tiene lugar en plantas *ocp3* (figura 1F). Este efecto antagonista de SA fue específico para la expresión de *PDF1.2*, ya que la expresión de *GST6* no se reprimía en *ocp3* tras el tratamiento con SA. En su lugar, SA promovió la activación de *GST1* en plantas de tipo silvestre (figura 1F). Esta última observación refuerza la asociación existente entre SA y ROS como se ha documentado previamente por otros autores (Mur *et al.*, 2000; Shirasu *et al.*, 1997; Tierens *et al.*, 2002), pero también indica que el estrés oxidativo que media la expresión de *GST1* en plantas *ocp3* y la expresión conjunta de *PDF1.2* podría ser independiente de SA.

Para evaluar más directamente si SA pudiese contribuir al fenotipo de plantas *ocp3* en relación con la resistencia observada a patógenos necrótrofos, cruzamos el transgen *nahG* en *ocp3*. *nahG* codifica una salicilato hidroxilasa que bloquea la ruta de SA por medio de la degradación de SA (Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, S., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Guttrelle, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266, 1247-1250).

Las plantas *ocp3 nahG* retenían la resistencia a las infecciones por *B. cinerea* (figura 3A-B) y *P. cucumerina* (figura 3C) a niveles similares a los de las plantas *ocp3*. De forma similar, cuando plantas *pad4*, que también están afectadas en la acumulación de SA después del ataque por patógenos (Zhou, N., Tootle, T.L., Tsui, F., Klessig, D.F., and Glazebrook, J. (1998). *PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1021-1030.), se sometieron a introgresión en plantas *ocp3*, las plantas *ocp3 pad4* resultantes permanecieron tan resistentes a *B. cinerea* (figura 3A-B) o a *P. cucumerina* (figura 3C) como las plantas *ocp3*.

Para ampliar adicionalmente estos estudios, se creó un mutante doble *ocp3 npr1-1*. El mutante *npr1-1* se identificó originalmente por su insensibilidad a SA y actualmente se considera el regulador principal de las respuestas mediadas por SA (Durrant y Dong, 2004). Como se observa para plantas *ocp3 nahG* y *ocp3 pad4*, la resistencia de plantas *ocp3 npr1-1* a hongos necrotróficos también se mantuvo invariable con respecto a la observada en plantas *ocp3* (figura 3A-C). De esta manera, todos estos resultados indican que parece ser que SA no se requiere para mejorar la resistencia a patógenos necrotróficos atribuibles a la mutación *ocp3*.

Como alternativa a SA, se evaluó la importancia de JA en la contribución al fenotipo de plantas *ocp3*. Se ensayó si un defecto en la percepción de esta hormona puede afectar a la mejor resistencia observada de plantas *ocp3* a hongos necrotróficos. El mutante *coi1* de *Arabidopsis* es totalmente insensible a JA y se requiere la proteína COI1 para todas las respuestas dependientes de JA identificadas hasta ahora. COI1 codifica una proteína F-box implicada en la degradación mediada por ubiquitina de la señalización por JA por medio de la formación de complejos de ubiquitina ligasa de tipo E3 funcionales (Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G. (1998). *COI1: An Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility*. *Science* 280, 1091-1094.; Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sharratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G. (2002). *COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis*. *Plant J.* 32, 457-466). Además, las plantas *coi1* no pueden expresar *PDF1.2* y muestran una mayor sensibilidad a hongos necrotróficos (Thomma et al., 1998; Turner et al. 2002). Todo esto indica la importancia de JA en la resistencia de plantas a este tipo de patógenos, y justifica la introgresión de *coi1* en *ocp3* para generar plantas mutantes dobles *ocp3 coi1* (figura 4). De manera importante, la mayor resistencia observada en plantas *ocp3* a *B. cinerea* y *P. cucumerina* se anula cuando está presente la mutación *coi1* (figura 4A-C). Las plantas *ocp3 coi1* se comportan como plantas *coi1*, que están muy afectadas tras la infección con cualquier hongo, extendiéndose las lesiones necróticas a lo largo de las hojas inoculadas como se ejemplifica en la figura 4C para la respuesta a *P. cucumerina*.

Además, de *coi1*, se consideró el estudio de *jin1*, otro mutante insensible a JA (Berger, S., Bell, E., and Mullet, J.E. (1996). *Two Methyl Jasmonate-Insensitive Mutants Show Altered Expression of AtVsp in Response to Methyl Jasmonate and Wounding*. *Plant Physiol.* 111, 525-531.) en relación con el mutante *ocp3*. JIN1 es un factor de transcripción de tipo MYC del tipo bHLHzip que funciona de una manera dependiente de COI1 (Lorenzo et al., 2004). A diferencia de lo que ocurre con *coi1* y a pesar del defecto en la señalización con JA, las plantas *jin1* muestran una mayor resistencia a patógenos necrotróficos, indicando que JIN1 puede funcionar como represor de la resistencia a este tipo de patógenos. De manera interesante, las plantas mutantes dobles *ocp3 jin1* se mantuvieron muy resistentes cuando se ensayaron contra la infección por *B. cinerea* (figura 4A) y a niveles comparables a los conseguidos por las plantas *ocp3* o *jin1*. Es importante mencionar que la mutación *ocp3* ni confiere sensibilidad a JA (de acuerdo con el ensayo de inhibición de crecimiento de las raíces en presencia de JA) ni es alélica a *jin1*. Esto indica que podría haber una cierta redundancia o solapamiento de funciones para los dos mutantes en consideración, para mejorar la resistencia a *B. cinerea* que finalmente se induce por JA y se controla por COI1.

También se ha demostrado que el etileno (ET) media ciertos aspectos de las respuestas de las plantas a patógenos (Berrocal-Lobo, M., Molina, A., and Solano, R. (2002). *Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi*. *Plant J.* 29, 23-32.; Thomma et al., 2001). Sin embargo, la señalización con ET también puede funcionar independientemente de JA, o incluso inhibir respuestas dependientes de JA (Ellis, C. and Turner, J.G. (2001). *The Arabidopsis mutant cev1 has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens*. *Plant Cell*, 13, 1025-1033.; Thomma et al., 2001). Para ensayar la importancia de ET en la respuesta de resistencia mediada por la mutación *ocp3*, se cruzaron plantas *ocp3* con el mutante *ein2* insensible a ET (Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Ecker, J.R. (1999). *EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis*. *Science*, 284, 2148-2152) para generar el mutante doble *ocp3 ein2*. Como se observa en la figura 2B-C, la resistencia de plantas *ocp3 ein2* a *P. cucumerina* se mantuvo invariable en comparación con la observada en plantas *ocp3* (figura 4A-C), indicando de esta manera que para la resistencia observada mediada por *ocp3*, es dispensable la hormona vegetal ET.

Aislamiento de *OCP3*

Para determinar la naturaleza de la mutación, se realizó un retrocruzamiento entre plantas *ocp3/ocp3* y plantas *OCP3/OCP3* de tipo silvestre que contenían el transgen Ep5C-GUS y se analizó la descendencia. En las plantas F1 resultantes de este cruce, estaba ausente la expresión constitutiva de la actividad GUS en las 21 plántulas ensayadas, y en las plantas F2, la expresión estaba presente en 31 de 118 plántulas. La relación de segregación de F2 del fenotipo conferido por *ocp3* fue 1:3 (expresadores constitutivos: no expresadores, $\chi^2 = 1,48$ ($0,1 > P > 0,5$)), indicando una sola mutación recesiva. El mutante *ocp3* se sometió a retrocruzamiento con *Lansberg erecta* de tipo silvestre (Ler) para generar una población de mapeo de F2 y las plántulas recombinantes se identificaron por medio del uso de marcadores de polimorfismos de longitud en las secuencias simples (SSLP) (Bell, C.J., and Ecker, J.R. (1994). *Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of Arabidopsis*. *Genomics* 19, 137-144.). Se aisló ADN, inicialmente, a partir

de 38 plantas homocigotas *ocp3* y la segregación de los marcadores SSLP indicó que *ocp3* mostraba una asociación al marcador Nga249 en el cromosoma 5, donde de los 76 alelos analizados todos fueron alelos Col-0 (0 *erecta*: 76 Col-0). Otro análisis de las plantas *ocp3* seleccionadas con marcadores adicionales disponibles para el cromosoma 5 identificaron los marcadores SSLP Nga249 y *ca72* como marcadores más próximos que flanqueaban la mutación *ocp3* en cada lado (figura 5A). La selección de 1100 plantas elegidas aleatoriamente de una población de mapeo F2 Ler x *ocp3* con los marcadores SSLP Nga249 y *ca72* identificó 29 plantas que tenían una recombinación en el intervalo. Usando estas 29 plantas recombinantes, se vio que OCP3 estaba localizado a 4 cM de Nga249 y a 1,9 cM de *ca72*. Se diseñaron otros marcadores polimórficos para la región comprendida entre Nga249 y *ca72* y la posición de OCP3 se estrechó hasta una región genómica que incluía el extremo del clon artificial bacteriano (BAC) T5KB y el comienzo del clon BAC F2I11. En la secuencia comentada comprendida dentro de estos dos clones BAC están presentes 19 genes (figura 5B). Se amplificó la región codificante entera de cada uno de estos genes en plantas *ocp3* y se determinaron las secuencias de los productos de PCR. La secuencia correspondiente al gen At5g11270 se identificó como la única que mostraba una sola sustitución de nucleótidos (de G a A en la cadena codificante (exón 3)) que producía una sola sustitución de aminoácidos (de Ala a Thr) (figura 5C). No se encontró ninguna mutación en los dieciocho genes restantes. At5g11270 contiene dos intrones y codifica una proteína de 553 aminoácidos.

Para asignar inequívocamente At5g11270 como *OCP3*, se introdujo un fragmento de 3,2 Kb que contenía At5g11270 en *ocp3* por transformación mediada por *Agrobacterium*. Se ensayaron tres líneas transgénicas con respecto a la expresión constitutiva de GUS y con respecto a la resistencia a *B. cinerea* y *P. cucumerina*. En todas ellas, la expresión constitutiva de GUS estaba anulada y se había recuperado la susceptibilidad normal a los patógenos fúngicos, demostrando que At5g11270 es *OCP3* (la figura 5D-E resume el resultado de esta complementación para una de las líneas transgénicas generadas; línea 2AT).

La expresión de OCP3 se reprime parcialmente por infección fúngica

Se analizó la expresión de OCP3 en respuesta a la infección con un patógeno fúngico necrotrófico en plantas de tipo silvestre a diferentes intervalos de tiempo después de la infección. En ningún tejido analizado se pudieron detectar niveles de ARNm de *OCP3* por análisis de transferencia de Northern, indicando que el gen *OCP3* se transcribe a una velocidad muy baja. Para solucionar esta dificultad, se estudió la presencia de ARNm de *OCP3* por RT-PCR. Estos análisis revelaron que *OCP3* se expresa constitutivamente en tejido de hoja de plantas sanas. La figura 6 demuestra que después de la infección con *P. cucumerina* hay una reducción en el nivel de acumulación de los ARNm de *OCP3*, siendo más evidente a las 72 horas después de la infección. Conjuntamente con esta reducción, y correlacionado inversamente, el gen marcador inducible por JA y por hongos PDF1.2 está regulado positivamente tras la infección con *P. cucumerina*. En etapas posteriores de la infección, también tiene lugar una expresión inducida del gen PR1 relacionado con la defensa y es indicativo del deterioro de tejidos que se produce como resultado del hábito de crecimiento del hongo.

La regulación negativa de OCP3 tras la infección fúngica, su correlación inversa con la expresión inducida de PDF1.2 y la naturaleza recesiva de la mutación *ocp3* favorece la interpretación de que OCP3 funciona como un represor de la respuesta de resistencia a patógenos fúngicos en plantas de tipo silvestre.

Procesamiento aberrante de ARNm de At5g11270 en el mutante ocp3

Para identificar la estructura del gen OCP3 y su alelo mutante *ocp3*, se amplificó un fragmento de 1,2 Kb por reacción en cadena de la polimerasa mediada por la transcriptasa inversa (RT-PCR) a partir de plantas de tipo silvestre y mutantes *ocp3*, usando cebadores diseñados de acuerdo con la secuencia comentada del gen At5g11270. La secuenciación directa y la comparación de los productos de RT-PCR revelaron que el ADNc derivado de *ocp3* lleva una delección interna de 36 nucleótidos en lugar de la sustitución esperada de un solo nucleótido, identificada en las secuencias genómicas (figura 7). Esta delección corresponde a los primeros 36 nucleótidos del exón III. De esta manera, la transición de G a A identificada a nivel genómico en la cadena codificante del alelo de *ocp3* (figura 5C) provoca una alteración en el procesamiento normal para el ARNm derivado de *ocp3*. Esta corta delección provoca un desplazamiento de fase en el marco de lectura abierta de *ocp3* que tiene como resultado la generación de un codón de terminación en fase que produce una proteína truncada de 210 restos aminoácidos en lugar de los 354 restos de la proteína de tipo silvestre (véase más adelante, figura 8). Esta delección se confirmó adicionalmente en diferentes plantas *ocp3* por RT-PCR, usando una serie de cebadores internos, y diseñados a partir de la secuencia genómica (figura 7A). Se obtuvieron productos de longitudes esperadas en todas las reacciones, excepto cuando se usaba el cebador interno a la secuencia delecionada, que no tuvo como resultado ningún producto de RT-PCR en muestras derivadas de plantas *ocp3* (figura 7B). De esta manera, la falta de función atribuida genéticamente a la mutación *ocp3* recesiva, no se debe a un cambio de aminoácido debido a la única sustitución de nucleótidos observada en la secuencia genómica; en su lugar, reside en un procesamiento anormal del ARNm transcrito a partir de la versión mutada de *ocp3*, que tras la traducción produce una proteína truncada que carece de 144 residuos aminoácidos de la parte C-terminal (figura 7 y 8).

OCP3 codifica un factor de transcripción homeobox

La secuenciación del ADN demostró que el ADNc de OCP3 codifica una proteína de 354 restos aminoácidos (figura 8A) de 39111 D y un pI de 4,53. OCP3 contiene diferentes características destacables. Cerca del extremo C-terminal se identifica un dominio de 60 aminoácidos (posición 284 a 344) que se parece al de un homeodominio (HD)

codificado por genes homeobox de diversos organismos (Gehring, W.J., Affolter, M. and Bürglin, T. (1994). *Homeodomain proteins. Annu Rev Biochem*, 63, 487-526.). El homeodominio de OCP3 comparte la mayor parte de los aminoácidos muy conservados que constituyen la firma característica del módulo HD de 60 aminoácidos. La conservación de estos restos críticos (por ejemplo, L-16, Y-20 en lugar de F-20, I/L-34, I/L/M-40, W-48, F-49 y R-53) se identifica fácilmente en comparación con diferentes proteínas que contienen homeodominios de *Arabidopsis* que pertenecen a diferentes subgrupos de proteínas (figura 8C). La inspección de la secuencia de aminoácidos de OCP3 también reveló la presencia de dos señales de localización nuclear (NLS) bipartitas canónicas (Dingwall, C., and Laskey, R.A. (1991). *Nuclear targeting sequences consensus? Trends Biochem. Sci.* 16, 478-481.; Nigg, E.A. (1997). *Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanism and regulation. Nature* 386: 779-787.), RK-(X)₁₀-KKNKKK en las posiciones 64-81, y KK-(X)₁₀-RRSKR en las posiciones 294-310, estando ésta última escondida dentro del homeodominio (figura 8A). Estas características podrían estar mediando una dirección de la proteína al núcleo. Otra característica destacable de OCP3 es la presencia de una región extendida rica en restos ácidos (posiciones 84-181), una característica común a varios activadores de la transcripción (Cress, W. D., and S. J. Triezenberg. 1991. *Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. Science* 251:87-90.). La última característica identificable dentro de OCP3 es la presencia del motivo LxxLL canónico en las posiciones 101-105 (figura 8A). Este motivo es una secuencia característica que facilita la interacción de diferentes co-activadores de la transcripción a receptores nucleares y, de esta manera, es una característica de definición identificada en varias proteínas nucleares (Heery, D.M., E. Kalkhoven, S. Hoare, and M.G. Parker. 1997. *A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. Nature* 387: 733-736). Todos estos motivos estructurales, indican firmemente que OCP3 es una proteína nuclear implicada en la regulación de la transcripción en *Arabidopsis*. De acuerdo con un esquema de clasificación general para genes homeobox (<http://www.homeobox.cjb.net/>) OCP3 es único ya que se distingue de las clases principales de proteínas que contienen homeodominios encontradas en plantas, incluyendo KNOX o HD-ZIP. Además, OCP3 está presente como un gen de una sola copia en el genoma de *Arabidopsis*. Las búsquedas de secuencias en las bases de datos reveló una identidad extensiva de OCP3 con otras seis proteínas - de tomate (número de acceso del GenBank AW223899, identidad del 48,9%), patata (número de acceso del GenBank BQ112211, identidad del 48,3%), uvas (número de acceso del GenBank CD003732, identidad del 51,5%), arroz (número de acceso del GenBank AY224485, identidad del 49,5%), trigo (número de acceso del GenBank CK205563, identidad del 49,4%) y maíz (número de acceso del GenBank BG840814, identidad del 51,3%) - que, según se vio, tenían un alto grado de similitud de secuencia con OCP3 y con la conservación de los principales motivos estructurales mostrados anteriormente. Esto indica que la función de este tipo de regulador de la transcripción ha estado muy conservada en plantas a lo largo de la evolución.

Los datos presentados en la presente invención proporcionan evidencias de un papel de OCP3 en la regulación de resistencia a microorganismos patógenos necrotróficos. Una mutación recesiva en el gen *OCP3* tuvo como resultado una mayor resistencia de plantas *ocp3* a los patógenos fúngicos *Botrytis cinerea* y *Plectosphaerella cucumerina*, mientras que la resistencia a la infección por el oomicete *Peronospora parasitica* o la bacteria *Pseudomonas syringae* DC3000 se mantuvo invariable en las mismas plantas. De manera interesante, el gen *OCP3* se expresa a niveles muy bajos en plantas sanas y esta expresión constitutiva se reprime parcialmente durante el curso de la infección con un necrótrofo fúngico. Además, el fenotipo de resistencia conferido por la mutación *ocp3* se bloquea cuando se ensaya en el mutante *coi1* como organismo base, reteniendo las plantas dobles mutantes *ocp3 coi1* la mayor sensibilidad a los necrótrofos atribuible a *coi1*. Esto implica que *OCP3* participa en la respuesta de defensa regulada por JA. De hecho, la mutación *ocp3* recesiva confiere expresión constitutiva del gen *PDF1.2*, que codifica una proteína de defensa con un papel definido en la respuesta de defensa de las plantas mediada por JA (Thomma et al., 1998). Como la expresión de *PDF1.2* es completamente dependiente de *COI1* (Turner et al., 2002) y está en plantas mutantes *ocp3* sanas, se refuerza la consideración de que *OCP3* esté funcionando de una manera dependiente de *COI1* actuando como regulador negativo de la respuesta de defensa mediada por JA a patógenos necrotróficos. Otra característica importante de *ocp3* es la mayor acumulación de H₂O₂ que se observa que se produce en condiciones de reposo en las hojas de plantas *ocp3*, que va seguida de la expresión constitutiva del gen marcador inducible por H₂O₂ GST1 (Levine et al., 1994; Alvarez et al., 1998) pero sin síntomas indicativos de muerte celular. El H₂O₂ y otras moléculas ROI normalmente se producen en altos niveles durante la infección tanto por patógenos biotróficos como por patógenos necrotróficos y se han implicado como señales reguladoras para la respuesta de resistencia basal a estos patógenos (Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J. M., and Dietrich, R.A. (2003). *The BOS1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. Plant Cell* 15, 2551-2565; Tiedemann, A.V. (1997). *Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with Botrytis cinerea. Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50, 151-166). Sin embargo, de los patógenos ensayados en plantas *ocp3*, sólo se observó un aumento de la resistencia hacia patógenos necrotróficos, mientras que la resistencia a patógenos biotróficos permaneció intacta. Esta diferencia significativa indica que la mutación *ocp3* puede afectar a funciones específicas relacionadas con ROI por medio de la regulación de ciertas moléculas efectoras dirigidas hacia la sensibilización e identificación de un necrótrofo. De manera interesante, se ha demostrado que SA y H₂O₂ forman un circuito que es un bucle de retroalimentación durante el curso de una interacción planta-patógeno (Shirasu et al., 1997; Draper, J. (1997). *Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. Trends Plant Sci.* 2, 162-165.), y hay indicios que sugieren que SA puede ser necesario para una respuesta local a un necrótrofo tal como *Botrytis* en el punto de infección (Govrin, E.M., and Levine, A. (2000). *The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen Botrytis cinerea. Curr. Biol.* 10, 751-757; Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G., and Ausubel, F. M. (2003). *Arabidopsis local resistance to Botrytis cinerea involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. Plant J.* 35, 193-205).

Sin embargo, la síntesis y acumulación de SA ni se aumenta ni se reprime en plantas *ocp3*. Además, el análisis de plantas mutantes dobles para *ocp3* y reguladores clave de la acumulación y percepción de SA, tales como los mu-

tantes dobles *ocp3 pad4*, *ocp3 nahG* u *ocp3 npr1* generados en la presente invención, indica que SA no se requiere para la resistencia a necrótrofos mediada por *ocp3*. Además, la hormona vegetal etileno (ET) no parece ser necesaria para conseguir la mayor resistencia de *ocp3*. Aquí, la falta de percepción de esta hormona, como se estudió con las plantas mutantes dobles *ocp3 ein2*, no reprime ni reduce la resistencia característica de las plantas *ocp3* a *P. cucumerina*. Como JA y ET pueden funcionar en asociación o independientemente para la activación de rutas de señalización específicas (Thomma et al., 2001, Ellis y Turner, 2001), la resistencia independiente de ET de *ocp3* indica que OCP3 regula una ramificación específica de la ruta de JA. Además, esta ramificación parece ser independiente de la otra que se ha propuesto que se controla por el factor de transcripción JIN1 regulado por JA (Lorenzo et al., 2004), ya que no se encontró epistasis entre *ocp3* y *jin1* al menos cuando se ensayó la resistencia a *B. cinerea*. De esta manera, todas estas observaciones confirman el importante papel de OCP3 en la regulación específica de una resistencia dependiente de COI1 a patógenos necrotróficos. OCP3 es un miembro de la familia de genes homeobox. Las proteínas homeobox son ubicuas en organismos superiores y representan cambios maestros de control implicados en procesos de desarrollo y en la adaptación celular a cambios en el medio. Funcionan como reguladores de la transcripción que se caracterizan por la presencia de un homeodominio (HD) conservado evolutivamente responsable de la unión específica al ADN (Gehring et al., 1994). En las plantas, se han identificado dos clases principales de genes que codifican HD: la clase de HD representada por KNOTTED I (Vollbrecht, E., Veit, S., Sinha, N. and Hake, S. (1991). *The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. Nature* 350, 241-243), y la familia de proteínas HD-Zip (Schna, M., and Davis, R. W. (1992). *HD-Zip proteins: members of an Arabidopsis homeodomain superfamily. Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 3894-3898). La última está caracterizada por un motivo de cremallera de leucina adicional, adyacente al HD que facilita la homo y heterodimerización de los reguladores de la transcripción. La caracterización funcional de algunos miembros de la familia homeobox, confirma un papel para algunos de ellos como reguladores clave de la señalización con hormonas (Himmelbach, A., Hoffmann, T., Laube, M., Hohener, B., and Grill, E. (2002). *Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. EMBO J* 21: 3029-3038.), en respuestas de adaptación a parámetros ambientales (Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G. and Ruberti, I. (1999). *Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-Zip protein, a negative regulator of gene expression. Development*, 126, 4235-4245.; Zhu, J., Shi, H., Lee, B.-h., Damsz, B., Cheng, S., Stirm, V., Zhu J-K, Hasegawa, P., Bressan, R.A. (2004). *An Arabidopsis homeodomain transcription factor gene, HOS9, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9873-9878), y en procesos de señalización derivados de patógenos (Magda, E., Tornero, P., Conejero, V., and Vera, P. (1999). *A tomato homeobox gene (HD-Zip) is involved in limiting the spread of programmed cell death. Plant J.* 20, 591-600.).

La mutación puntual identificada en *ocp3* tiene como resultado un procesamiento anormal del transcrito correspondiente que provoca una delección interna donde los primeros 36 nucleótidos del exón III ya no están presentes en el ARNm de *ocp3* maduro. Esta corta delección provoca un desplazamiento de fase en la ORF de *ocp3* que tiene como resultado la generación de un codón de terminación prematuro. De esta manera, esta mutación produce una proteína *ocp3* truncada que consta de 210 restos aminoacídicos en lugar de los 354 restos aminoacídicos característicos de OCP3. El dominio de 60 aminoácidos previsto correspondiente al homeodominio (HD) está localizado dentro del dominio C-terminal de 144 aminoácidos que falta en *ocp3*. Como este dominio es determinante para que las proteínas homeobox funcionen como reguladores de la transcripción, ya que es el sitio donde se establece el contacto con el ADN, principalmente a través de la hélice 3 del dominio HD, que se dirige al surco principal de la hélice de ADN presente en la región promotora de genes cadena abajo (Gehring et al. 1994), es concebible que la proteína *ocp3* mutada ya no funcione como un regulador de la transcripción. Por tanto, OCP3 funciona como un factor de transcripción específico de la ruta de transducción de señales de células vegetales dependiente de COI1 y mediada por JA y modula la transcripción de genes importantes para la respuesta o respuestas de defensa a patógenos necrotróficos.

La identificación de genes diana de OCP3 y la interacción con moléculas de proteínas asociadas es nuestro reto para el futuro. Además, la posible interacción de OCP3 con otros reguladores de la transcripción implicados en la respuesta de defensa a patógenos necrotróficos tales como la proteína JIN1 relacionada con MYC (Lorenzo et al., 2004), la proteína ERF1 de tipo AP2 (Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). *ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. Plant Cell* 15, 165-178.), la proteína BOS1 relacionada con MYB (Mengiste et al., 2003) o el factor de transcripción WRKY70 (Li et al., 2004), y cómo funcionan de una manera coordinada para regular la transcripción es otro reto interesante para el futuro. Todas estas estrategias deben ayudar a entender el mecanismo regulador de la función de OCP3 y cómo se puede explotar esta función para generar plantas más resistentes a patógenos fúngicos sin afectar a las respuestas de defensa frente a otros tipos de patógenos. Manipulando genéticamente el gen OCP3 mediante mecanismos de genética reversa en plantas transgénicas que repriman o alteren la expresión génica de OCP3, o bien alteren su funcionalidad como factor de transcripción, permitirá explotar agrónomicamente la función de OCP3 en la regulación de la respuesta defensiva de las plantas frente a dichas agresiones patogénicas.

Descripción de las figuras

Figura 1

Caracterización de plantas *ocp3* y comparación con plantas de tipo silvestre

(A) Una comparación del aspecto externo de plantas *ocp3* (a la derecha) y las plantas de tipo silvestre parentales (wt) (a la izquierda). Las plantas se fotografiaron a las 3,5 semanas de edad.

(B) Tinción histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de Ep5C en una plántula transgénica de tipo silvestre de 10 días (a la izquierda) y plántulas *ocp3* (a la derecha) cultivadas en medio de agar MS. La flecha indica una zona de tejido discreta en la unión del hipocotilo y la raíz donde se observa actividad GUS en las plántulas de tipo silvestre.

(C) Hojas en roseta totalmente expandidas de plantas transgénicas de tipo silvestre (a la izquierda) y de plantas *ocp3* (a la derecha) teñidas para determinar la actividad GUS.

(D) Producción de H₂O₂ en plantas de tipo silvestre (a la izquierda) y plantas *ocp3* (a la derecha). La producción de H₂O₂ se ensayó usando 3,3'-diaminobencidina. La coloración pardo-rojiza indica la polimerización de 3,3'-diaminobencidina en el sitio de producción de H₂O₂.

(E) Tinción de tejido de hoja de plantas de tipo silvestre (a la izquierda) y plantas *ocp3* (a la derecha) con azul trípano en la búsqueda de signos de muerte celular. La ausencia de colapso celular se revela por la falta de manchas de color azul intenso después de la tinción con azul trípano.

(F) Expresión de genes marcadores PR-1, PDF1.2 y GST1 en plantas de tipo silvestre y *ocp3* 36 horas después de que las plantas se pulverizaran con (+SA) o sin (-SA) una solución tampón que contenía ácido salicílico (SA) 0,3 mM.

Figura 2

Resistencia de plantas ocp3 a patógenos necrotróficos pero no a patógenos biotróficos

(A) Respuesta de resistencia de plantas *Arabidopsis* de tipo silvestre y mutantes *ocp3* a *Peronospora parasitica* virulento. Siete días después de la inoculación por pulverización de plantas de 2 semanas de edad con 10⁵ conidiosporas por mililitro de *Peronospora*, las hojas se tiñeron con lactofenol-azul trípano y se visualizaron con un microscopio para revelar el crecimiento extensivo característico de las hifas y las conidiosporas.

(B) Para cuantificar la resistencia a *P. parasitica*, la producción de conidiosporas se cuantificó siete días después de la inoculación con la ayuda de un hemocitómetro. Las plantas que llevaban la mutación *ocp3* fueron tan resistentes a este patógeno como las plantas de tipo silvestre.

(C) Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plantas de tipo silvestre y *ocp3*. En plantas de 4 semanas de edad se infiltró una suspensión bacteriana, y se determinó la titulación bacteriana, medida como c.f.u. por peso fresco, a los 0, 3 y 5 días después de la infección en plantas de tipo silvestre (líneas continuas) y *ocp3* (líneas discontinuas). Las barras de error representan los límites de confianza del 95% de los datos transformados en logaritmos. Se tomaron 8 muestras para cada genotipo en cada punto de tiempo. El experimento se repitió 3 veces obteniéndose resultados similares.

(D) Hojas representativas de plantas de tipo silvestre y *ocp3* 4 días después de la inoculación con una gota de 6 µl de una suspensión de esporas (5 x 10⁶ esporas/ml) de *P. cucumerina*.

(E) Los síntomas de la enfermedad medidos como el tamaño de la lesión se evaluaron 6 días después de la inoculación con *P. cucumerina* determinando los diámetros medios de la lesión en 3 hojas de 8 plantas. Los puntos de datos representan el tamaño medio de la lesión ± SE de las medidas.

(F) Hojas representativas de plantas de tipo silvestre y *ocp3* 4 días después de la inoculación con una gota de 6 µl de esporas de *Botrytis cinerea* (2,5 x 10⁴ conidios/ml).

(G) El tamaño de la lesión generada por *Botrytis cinerea* se midió 6 días después de la inoculación. Los puntos de datos representan el tamaño medio de la lesión ± SE de las medidas para un mínimo de 30 lesiones.

Todos los experimentos se repitieron al menos 3 veces con resultados similares. wt, tipo silvestre.

Figura 3

Efecto de mutaciones relacionadas con SA sobre la respuesta de resistencia a enfermedades de plantas ocp3

(A) Respuesta de resistencia de mutantes dobles *ocp3 nahG*, *ocp3 npr1* y *ocp3 pad4* a *Botrytis cinerea* en comparación con la de genotipos mutantes simples y plantas de tipo silvestre. Las plantas se inocularon y los síntomas de la enfermedad se evaluaron como se describe en la figura 2 determinando los diámetros medios de la lesión en 3 hojas de 8 plantas.

(B) Hojas representativas de cada genotipo que muestran síntomas de la enfermedad observadas 5 días después de la inoculación con una gota de 6 µl de esporas de *Botrytis cinerea* (2,5 x 10⁴ conidios/ml).

(C) Respuesta de resistencia de mutantes dobles *ocp3 nahG*, *ocp3 npr1* y *ocp3 pad4* a *Plectosphaerella cucumerina* en comparación con la de genotipos mutantes simples y plantas de tipo silvestre. Las mediciones de la lesión se

realizaron determinando los diámetros medios de la lesión en 3 hojas de 8 plantas. Los puntos de datos representan el tamaño medio de la lesión $\pm$ SE de las medidas.

Figura 4

Efecto de mutaciones relacionadas con JA y ET sobre la respuesta de resistencia a enfermedades de plantas ocp3

(A) Respuesta de resistencia de mutantes dobles *ocp3 coi1* y *ocp3 jin1* a *Botrytis cinerea* en comparación con la de genotipos mutantes simples y plantas de tipo silvestre. Las plantas se inocularon y los síntomas de la enfermedad se evaluaron como se describe en la figura 2 determinando los diámetros medios de la lesión en 3 hojas de 8 plantas.

(B) Respuesta de resistencia de mutantes dobles *ocp3 coi1* y *ocp3 jin1* a *Plectosphaerella cucumerina* en comparación con la de genotipos mutantes simples y plantas de tipo silvestre. Los síntomas de la enfermedad se evaluaron determinando los diámetros medios de la lesión en 3 hojas de 8 plantas.

(C) Hojas representativas de cada genotipo que muestran síntomas de la enfermedad observadas 7 días después de la inoculación con una gota de 6 μ l de esporas de *P. cucumerina* (5×10^6 esporas/ml).

Los puntos de datos representan el tamaño medio de la lesión $\pm$ SE de las medidas.

Figura 5

Clonación posicional de ocp3 y complementación inversa

(A) Región de 0,6 Mb en la parte superior del cromosoma 5 con BAC solapantes flanqueados por los marcadores SSLP Nga249 y ca72 usados para la selección de recombinaciones en 2200 cromosomas.

(B) Localización de *OCP3* en el clon BAC secuenciado F2111. *OCP3* se colocó entre dos marcadores SSLP que comprendían una región de 67,2 Kb de BAC F2111. Los 19 genes mencionados incluidos en esta región están indicados.

(C) Estructura de exones/intrones de *OCP3*. Las regiones codificantes están indicadas con líneas gruesas. El inserto presenta el cambio de nucleótidos y su influencia sobre la secuencia de la proteína. El alelo mutante está indicado debajo de la secuencia del tipo silvestre. Las letras minúsculas marcan secuencias de nucleótidos al principio del exón 3. La transición de G a A debida al mutágeno está indicada en mayúsculas y en negrita. Las secuencias de aminoácidos deducidas están indicadas en el código de una sola letra con mayúsculas debajo de cada triplete de nucleótidos y las letras en negrita marcan los cambios de aminoácidos (de Ala a Thr) en las secuencias de las proteínas.

(D) Respuesta de resistencia de plantas *ocp3* transgénicas (línea 2AT) transformadas de manera estable con una secuencia de ADN genómico de 3,2 Kb que incluye el gen At5g11270 entero y comparación con la respuesta de resistencia observada en las plantas de tipo silvestre y en el mutante *ocp3*. Las plantas se inocularon como se describe en la figura 2 con *B. cinerea* (a la derecha) y *P. cucumerina* (a la izquierda) y los síntomas de la enfermedad se evaluaron determinando los diámetros medios de la lesión en 3 hojas de 8 plantas. Los puntos de datos representan el tamaño medio de la lesión $\pm$ SE de las medidas.

(E) Tinción histoquímica de la actividad GUS dirigida por el promotor de Ep5C en hojas en roseta totalmente expandidas obtenidas a partir de plantas *ocp3* (a la izquierda) y de plantas *ocp3* transgénicas transformadas con el gen At5g11270 (línea 2AT) (a la derecha).

Figura 6

Expresión de OCP3 y genes marcadores de respuesta de defensa después de la infección con P. cucumerina

Análisis de RT-PCR de la expresión de *OCP3*, PDF1-2 y PR-1 en tejidos de hoja infectados con *P. cucumerina*. Se inocularon plantas de tipo silvestre por pulverización con una suspensión de 10^5 esporas/ml, y el tejido se congeló para la extracción del ARN. Los números indican horas después de la inoculación. Los geles de la parte inferior muestran RT-PCR para el gen interno *elf4 α* usado como control de carga. El experimento se repitió dos veces obteniéndose resultados similares.

Figura 7

Análisis de ADNc de OCP3 y de ocp3

(A) Diagrama de estructura de exones/intrones de *OCP3*. Los exones se indican con líneas gruesas. En el inserto se indica la secuencia de nucleótidos en la unión de empalme en el exón 3. Las letras minúsculas marcan secuencias de intrones, las letras mayúsculas indican secuencias de exones, las letras mayúsculas en negrita indican aminoácidos y las flechas indican la substitución de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente. Las flechas en la parte superior del gen esquematizado indican la diferente posición de los cebadores usados en los experimentos de RT-PCR.

PfullD1 está localizado al principio del exón 1; pfullR1 está localizado el final del exón 4; pD1 al final del exón 2; pD2 al principio del exón 3 y pR1 en medio del exón 3. D indica la orientación directa (de 5' a 3') mientras que R denota la orientación inversa (de 3' a 5').

(B) Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR obtenidos cuando se usa ARNm de plantas de tipo silvestre (wt) y ocp3 y diferente combinación de cebadores. Obsérvese la reducción del peso molecular y, de esta manera, la migración más rápida de la banda amplificada procedente de plantas ocp3 con cebadores pD1+pR1 en comparación con la obtenida de plantas de tipo silvestre. Obsérvese también la ausencia del producto de ADN amplificado cuando se usan cebadores pD2+pR1 y ARNm transcrito con transcriptasa inversa procedente de plantas ocp3, pero no de plantas de tipo silvestre. La ausencia de producto amplificado indica una falta de reconocimiento por uno de los dos cebadores en la plantilla de ADNc generada a partir de plantas ocp3. El experimento se repitió varias veces con ARNm derivado de 4 plantas de tipo silvestre y ocp3 diferentes.

(C) Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos derivada de clones de ADNc derivados de ARNm aislado a partir de plantas de tipo silvestre (OCP3) y mutantes (ocp3). Los productos transcritos de forma inversa se amplificaron con cebadores pfullD1 y pfullR1 y se secuenciaron completamente las dos cadenas. Obsérvese la delección interna de 36 nucleótidos en todos los ADNc de ocp3 secuenciados. Esta subrayada la secuencia de nucleótidos común a los ADNc derivados de ocp3 y OCP3. La delección interna en los ADNc de ocp3 influye sobre la secuencia de aminoácidos derivada y provoca un desplazamiento de fase que genera un codón de terminación prematuro en la proteína ocp3. Las letras mayúsculas en negrita marcan aminoácidos y los asteriscos indican un codón de terminación. La flecha indica la presencia y posición del nucleótido (G) en el ADNc de OCP3 que si se muta produce el fenotipo ocp3. Los resultados se reprodujeron varias veces con ARNm derivado de diferentes plantas de tipo silvestre y ocp3 y en diferentes fases de crecimiento.

Figura 8

Proteína OCP3 y comparación con otras proteínas que contienen homeodominios de Arabidopsis

(A) Secuencia de aminoácidos prevista de OCP3. El homeodominio se muestra en negrita. Las dos señales de identificación conservadas para la localización nuclear están subrayadas. El dominio ácido se muestra en cursiva y el dominio que interacciona con la proteína nuclear (LxxLL), incluido dentro de esta región ácida, se muestra subrayado.

(B) Estructura proteica prevista de OCP3. Se indica la posición relativa de señales de localización nuclear (NLS), del dominio de interacción con la proteína nuclear (LxxLL), del dominio ácido y del homeodominio (HD).

(C) Alineación de secuencias que muestra la secuencia de aminoácidos C-terminal de OCP3 con el homeodominio de diferentes genes homeobox de *Arabidopsis* incluyendo miembros de la familia KN y HD-Zip. El asterisco encima de las alineaciones corresponde a posiciones de aminoácidos en el HD que están muy conservadas en todos los organismos y define la señal de identificación del homeodominio. El sombreado negro indica aminoácidos conservados en todas las entradas, y el sombreado gris indica aminoácidos con características fisicoquímicas muy similares.

Exposición detallada de un modo de realización

Plantas, condiciones de crecimiento y tratamientos

Se cultivaron plantas *Arabidopsis thaliana* en sustrato o en placas que contenían medio de Murashige y Skoog (MS) como se ha descrito previamente (Mayda et al., 2000). El mutante ocp3 se aisló en una investigación de expresadores constitutivos del gen indicador Ep5C-GUS en plantas transgénicas Columbia (Col-0) mutagenizadas con metanosulfonato de etilo (EMS), como se ha descrito previamente para otro mutante (Mayda et al., 2000). La línea mutante ocp3 usada en estos experimentos se sometió tres veces a retrocruzamiento con la línea parental de tipo silvestre. Se cultivaron las plantas en una cámara de crecimiento a 20-22°C, humedad relativa del 85%, y 100 $\mu\text{Em}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de iluminación fluorescente, en un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Para todos los experimentos se usaron hojas completamente expandidas de plantas de cuatro semanas de edad (a menos que se indique otra cosa). Se realizó la tinción para determinar la presencia de H_2O_2 a través del método de captación de 3,3'-diaminobencidina (DAB), tal y como se ha descrito anteriormente (Thordal-Christensen et al., 1997). Se realizó la tinción para determinar la presencia de actividad GUS como se ha descrito previamente (Mayda et al., 2000).

Infección con patógenos

Se cultivó *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*P.s. tomato* DC3000) y se preparó para la inoculación como se ha descrito previamente (Mayda et al. 2000). Se determinó la densidad de las poblaciones de bacterias cultivando diluciones en serie en medio B de King suplementado con rifampicina (50 $\mu\text{g/ml}$) a 28°C y contando las unidades formadoras de colonias. Se presentaron los datos como medias y desviaciones típicas del logaritmo (cfu/cm^2) de al menos seis réplicas. Para los experimentos de resistencia a *Peronospora parasitica*, se pulverizaron plantas de tres semanas de edad con una suspensión de conidios de *P. parasitica* (10^5 conidiosporas ml^{-1} de agua corriente) como se

ha descrito previamente (Mayda et al., 2000). Se evaluó en el séptimo día, la densidad de las esporas en las plántulas (siete macetas por tratamiento, cada maceta tratada por separado) usando un hemocitómetro. Como alternativa, se tiñeron las muestras de hoja con lactofenol-azul tripano en diferentes días tras la inoculación y se examinaron con el microscopio como se ha descrito anteriormente (Mayda et al., 2000). Para la resistencia a *Plectosporium* y *Botrytis*, se trasplantaron plántulas de tres semanas a macetas individuales y se cultivaron a 22°C durante el día/18°C durante la noche, con doce horas de luz por 24 horas. Cuando las plantas tenían seis semanas, se inocularon aplicando gotas de 6 ml de suspensión de esporas de *Plectosphaerella cucumerina* (5×10^6 esporas ml^{-1}) o *Botrytis cinerea* ($2,5 \times 10^4$ conidios ml^{-1}) a 3 hojas completamente expandidas por planta. Se aisló *P. cucumerina* a partir de *Arabidopsis* infectada de manera natural (acceso *Landsberg erecta*) y se cultivó en agar de patata-dextrosa de 19,5 g/l (Difco, Detroit) a temperatura ambiente durante 2 semanas antes de recoger las esporas y de suspenderlas en MgSO_4 10 mM. *B. cinerea* (cepa BMM1, aislada a partir de *Pelargonium zonale*) se cultivó en agar de patata-dextrosa de 19,5 g/l (Difco, Detroit) a 20°C durante 10 días. Se recogieron los conidios y se suspendieron en PDS estéril (12 g l^{-1} , Difco). Las plantas se mantuvieron con una humedad relativa del 100% y los síntomas de la enfermedad se evaluaron de 4 a 10 días después de la inoculación determinando el diámetro medio de la lesión en 3 hojas de 5 plantas.

Análisis genético

Se realizaron cruces emasculando capullos no abiertos y usando los pistilos como receptores de polen. Se realizaron retrocruzamientos con la línea transgénica parental usando plantas Ep5C-GUS como donantes de polen. También se realizaron los cruces recíprocos. Se cultivaron plantas F1 y F2 en placas MS y se ensayaron con respecto a la actividad GUS. La segregación del fenotipo en la generación F2 se analizó con un ensayo chi-cuadrado para comprobar la calidad del ajuste.

Mapeo basado en PCR

Una planta ocp3 (en Columbia como base) se cruzó con *Landsberg erecta* y se usó para el mapeo la descendencia que segregaba mutantes homocigotos ocp3 tras la autofecundación. Se seleccionaron plántulas de la población F2 para la extracción del ADN y las plántulas recombinantes se identificaron usando marcadores de polimorfismos de longitud en las secuencias simples (SSLP) por el protocolo descrito por Bell y Ecker (1994) y con nuevos marcadores como se indica en el sitio web de la base de datos de *Arabidopsis* (<http://genome-www.stanford.edu>).

Generación de Mutantes Dobles

Los alelos mutantes usados a lo largo de esta invención fueron npr1-1 (Cao et al., 1997), pad4-1 (Zhou et al., 1998), coi1-1 (Xie et al., 1998), ein2-5 (Alonso et al., 1999) y jin1-1 (Lorenzo et al., 2004). Se han descrito las plantas transgénicas (en el ecotipo Columbia) que expresaban el gen nahG bacteriano (Reuber et al. 1998). Los mutantes dobles ocp3 npr1, ocp3 pad4, ocp3 coi1, ocp3 ein2, ocp3 jin1 y ocp3 nahG se generaron usando ocp3 como receptor del polen. La homocigosidad de los loci se confirmó usando marcadores moleculares para cada uno de los alelos en poblaciones de segregación. Todos los mutantes dobles se confirmaron en la generación F3, excepto las plantas ocp3 coi1 que fueron estériles y no pudieron propagarse en heterocigosidad para coi1. Para el mutante doble que contenía ein2-5, las semillas F2 se cultivaron en placas con MS que contenían ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) $20 \mu\text{M}$ y se pusieron en una cámara de crecimiento. Después de tres días en la oscuridad, las plántulas se evaluaron con respecto a la presencia o ausencia de la respuesta triple inducida por etileno (ET) (Guzman y Ecker 1990). El mutante ein2, que era insensible a ET, no presenta la respuesta triple. Se recogieron plantas F2 que carecían de la respuesta triple y se transfirieron al sustrato para evaluar la homocigosidad para ocp3.

Clonación de ADN genómico y ADNc

La secuencia genómica se usó como base para la clonación de ADNc y clones genómicos. Se aisló ARN poli(A*) a partir de diferentes plantas de tipo silvestre y ocp3 y se transcribió con transcriptasa inversa usando cebadores oligo (dT) como se ha descrito (Mayda et al., 1999). Éstos se usaron como plantillas para amplificar ADNc de OCP3 y de ocp3 usando diferentes combinaciones de los cebadores con especificidad de gen con sentido y antisentido:

pfullId1 (5'-GAATTCATGATAAAAGCCATGG-3'),
 pfullIR1 (5'-GTAACTCTAGATCTTTCCGGAG-3'),
 pD1 (5'-GGTGATGTTGATGTTGATGTTG-3'),
 pR1 (5'-CTTAGGTTTCGACCACAACATCTTCAG-3') y
 pD2 (5'-ATCTGGCAGCTGAGGTTTGTCTTG-3').

Complementación Inversa

Se amplificó la región genómica de OCP3 por PCR usando cebadores con especificidad de gen diseñados para incluir la región de 1,5 Kb cadena arriba del codón de iniciación y una parte de la región 3' que sigue al codón de terminación. Las secuencias de los cebadores genómicos de avance e inverso de OCP3 usados fueron:

(5'-GAGATTGGAACGTGGGTCGACTTTAG-3') y

(5'-TTCCTGAATTCATACTTTATCATAG-3'), respectivamente.

Se obtuvo un fragmento genómico de 3,2 Kb que contenía el gen At5g11270 de tipo silvestre por PCR usando cebadores y se clonó en pCAMBIA1300 para producir el clon pCAMBIAOCP3 que se transfirió a *Agrobacterium* y se usó para transformar plantas ocp3 por el método de inmersión floral (Bechtold, N., Ellis, J. And Pelletier, G. (1993). *In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants*. C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci. 316, 1194-1199).

Análisis de Expresión

Para analizar el nivel de expresión génica por PCR mediada por transcriptasa inversa, se prepararon muestras de ARN total a partir de tejidos de hoja usando el kit Totally RNA de Ambion (Austin TX). La transcripción inversa se realizó usando el kit de RT para PCR de Clontech (Palo Alto, CA).

La serie de cebadores oligonucleotídicos (50 pmol cada uno) usadas para amplificar OCP3 fueron: OCP3PCR1(5'-GCTTAAAAGACTGGCTTATGCATTG-3')/OCP3PCR2 (5'-GCTTTGGAGCGGGTCACGAAG-3').

Los cebadores usados para amplificar PDF1.2 fueron PDF1.2PCR1 (5'-ATGGCTAAGTTTGCTTCCAT-3')/PDF1.2PCR2(5'-ACATGGGACGTAACAGATAC-3').

Los cebadores usados para amplificar PR1 fueron PR1PCR1 (5'-ATGAATTTTACTGGCTATTC-3')/PR1PCR2 (5'-AACCCACATGTTTCACGGCGGA-3').

REIVINDICACIONES

1. Utilización del gen OCP3 en especies vegetales de interés agronómico, para la obtención de plantas transgénicas
resistentes a patógenos fúngicos necrotróficos.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

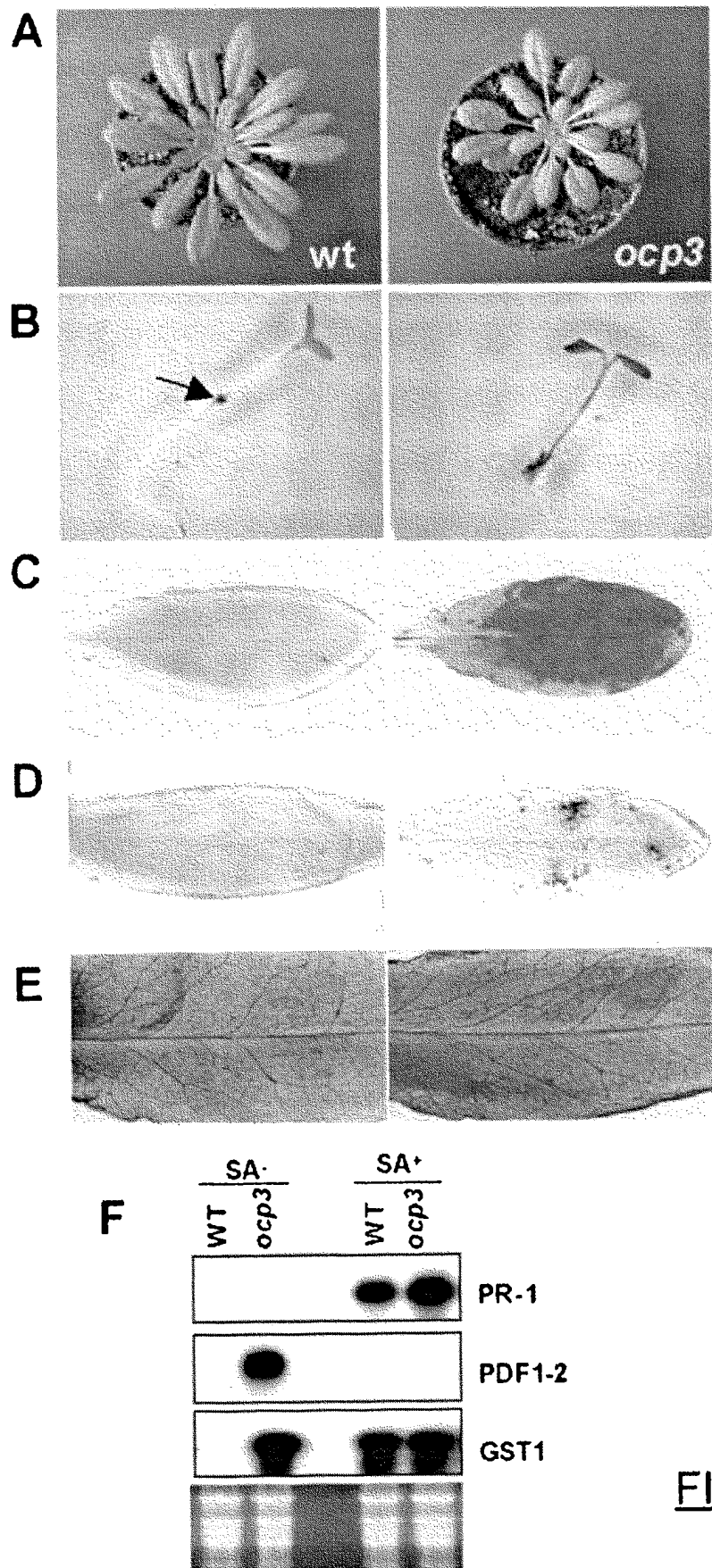


FIG. 1

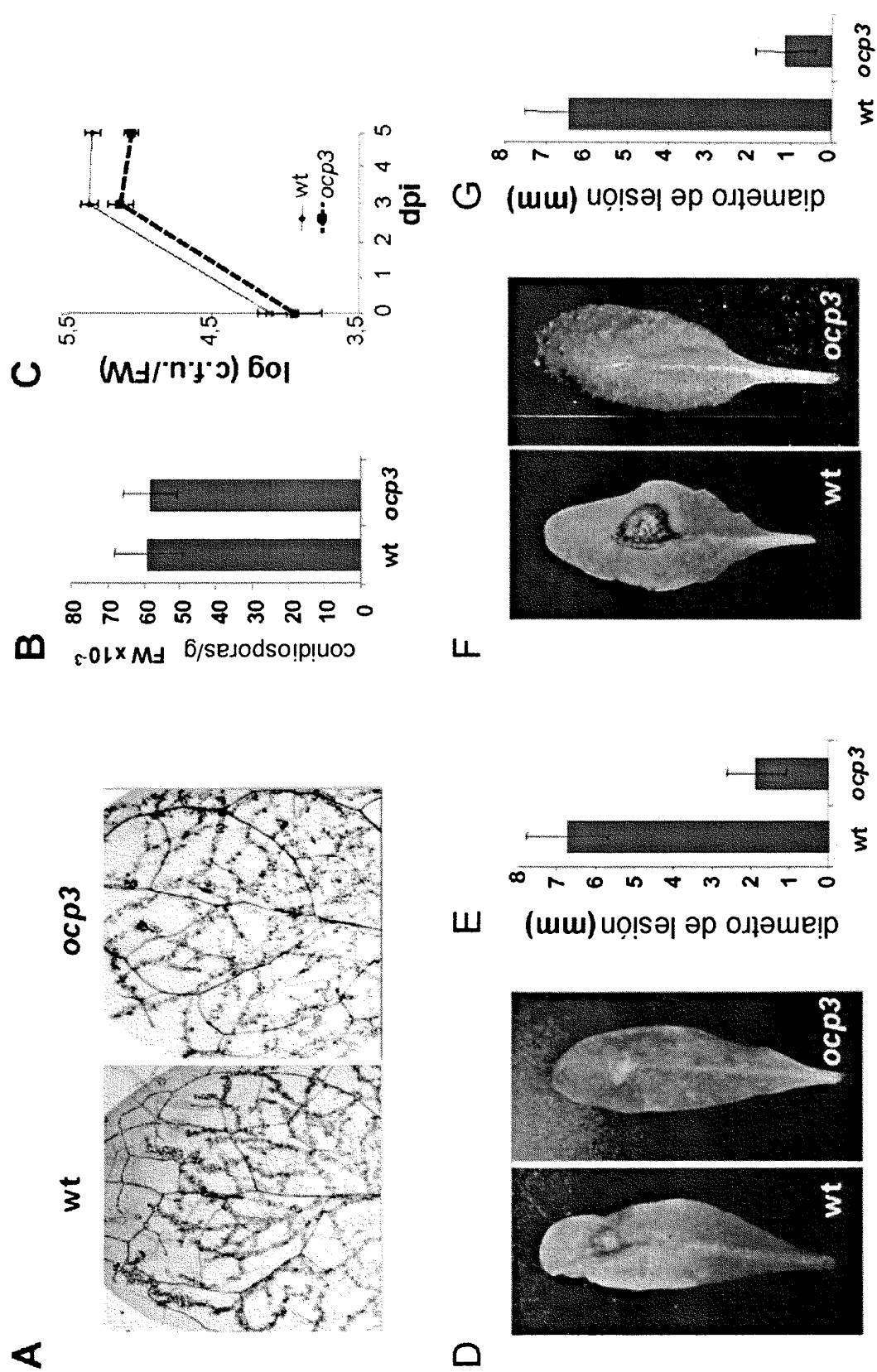
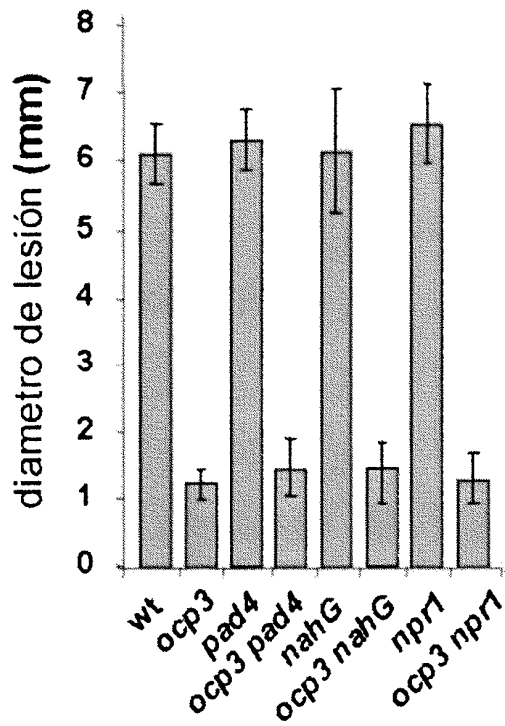
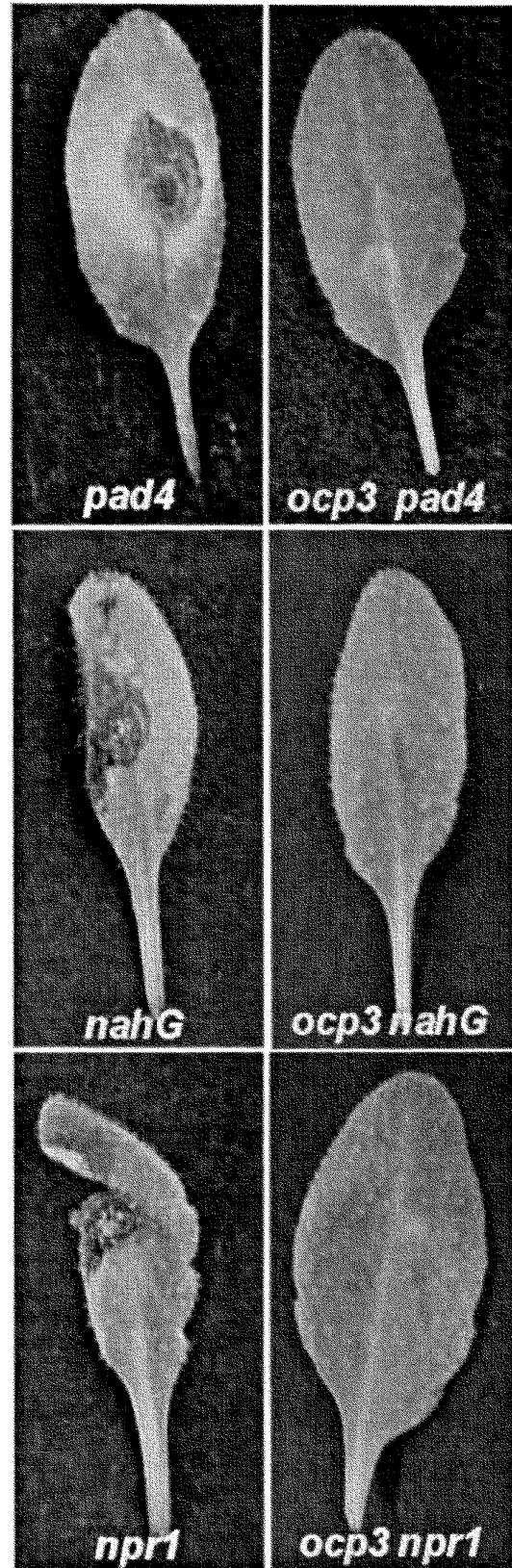


FIG.. 2

A

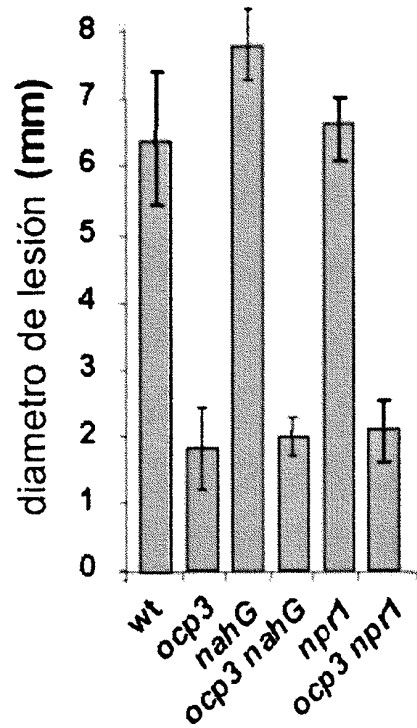


B



C

FIG. 3



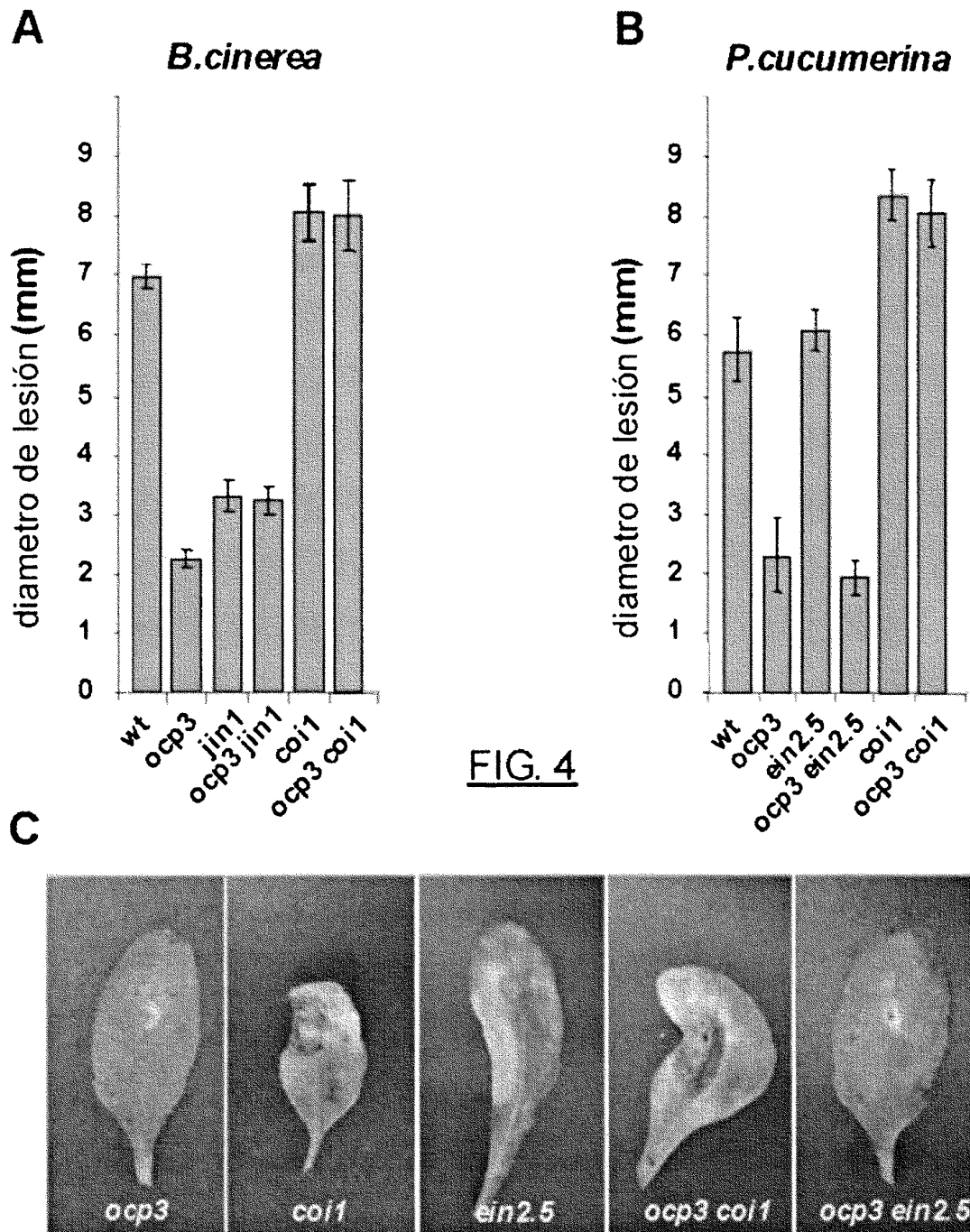


FIG. 4

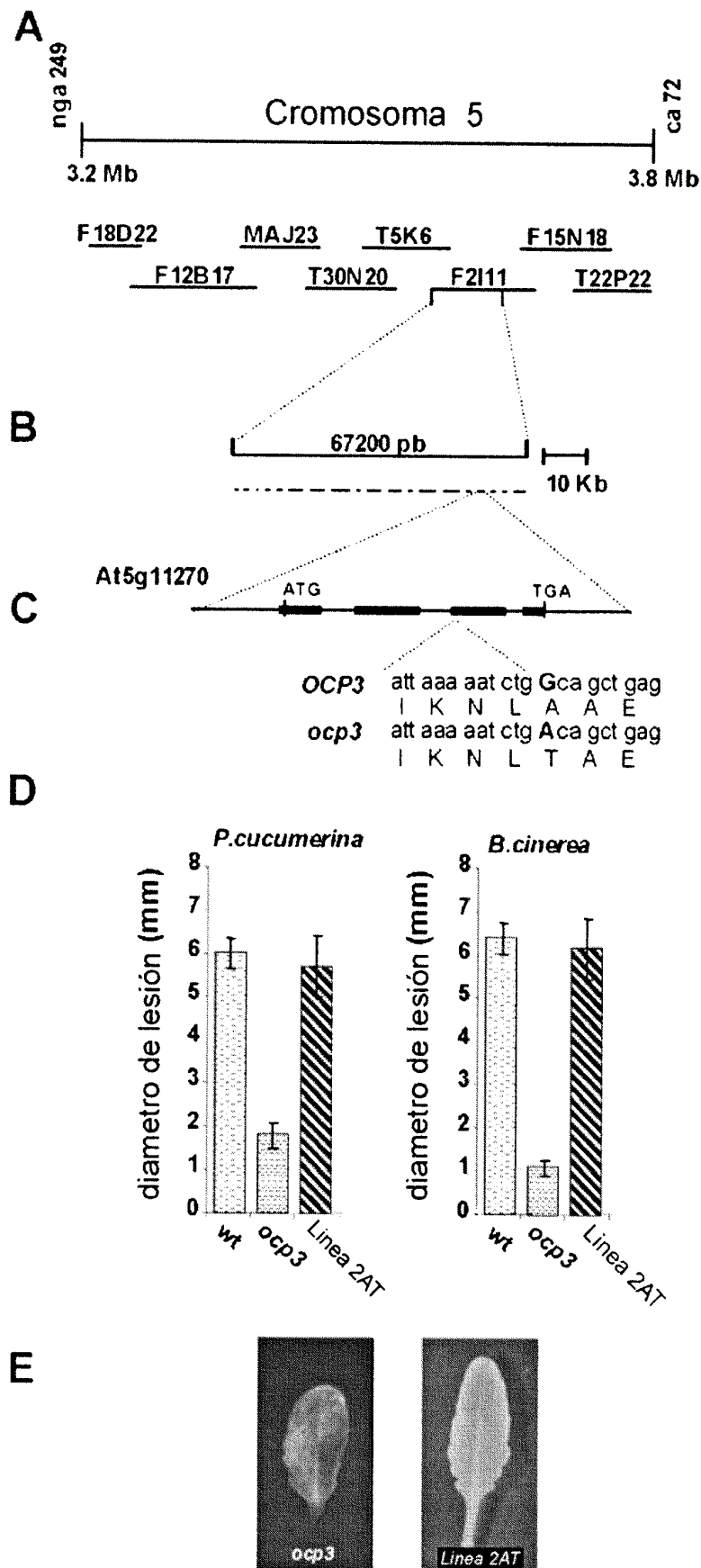
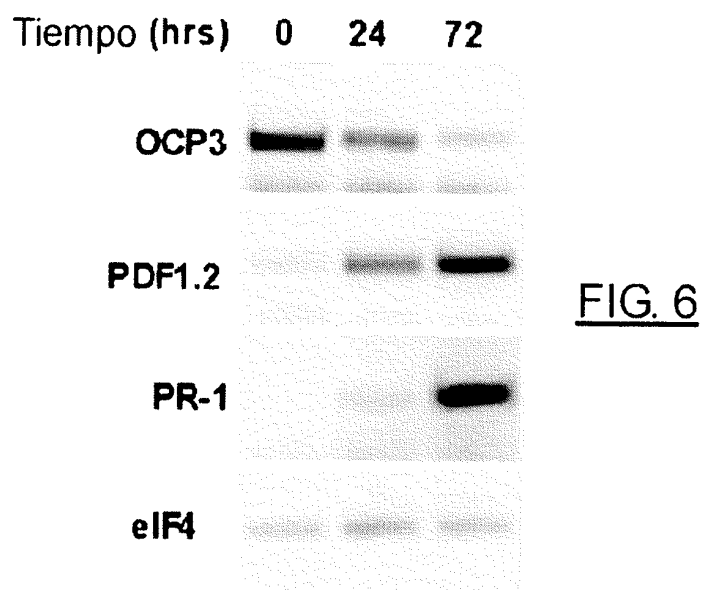
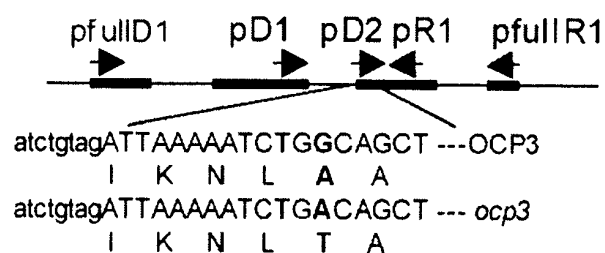


FIG. 5



A



B

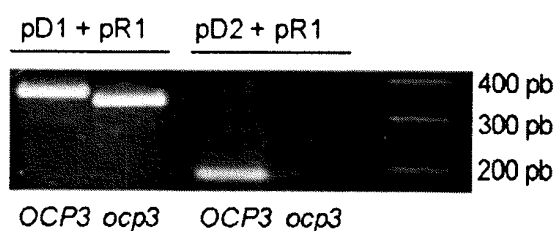


FIG. 7

C

OCP3 cDNA.....ACTAGTATTAAAAATCTGGCAGCTGAGGTTTGTCTTGACAGGGCTTATGTTCTTGAA ...

OCP3 354 aa T S I K N L A A E V C L D R A Y V L E.....

ocp3 cDNA ... ACTAGT.....GGCTTATGTTCTTGAA ...

ocp3 210 aa ... T S G L C S * terminación

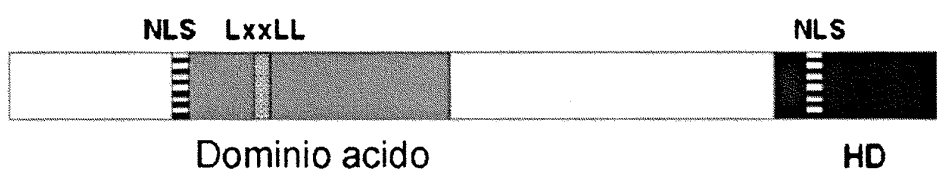
A

```

1  MIKAMALSSAGVVSHLHPPSFSSSSGLSVNRVLFNRNRNASPCGLSLPIINPSRSVLV FAR
61  GKNRKGEVSSSSSSPKKNKKKS LDGADNNGGEEEEEDPFEALFNLEEDLKNDNSDDEEIS
121  EEELEALADELARAIGVGDDVDDIDLFGSVTGVDVDVDNDDDDNDDDDNDDDDDDSEED
181  ERPTKLKNWQLKRLAYALKAGRRKTSIKNLAAEVCLDRAYVLELLRDPPPKLLMLSATLP
241  DEKPPVAAPENSSPDPSPVESLSAEDVVVEPKVKVDEAVHVMQQRWSAQKRVKKAHET
301  LEKYVRRSKRPTNAVVSIVQVTNLPRKRVLKWFEDKRAEDGVDPKRAPYQAPV

```

B



C

	HELIX 1	HELIX 2	HELIX 3/4
OCPE	* *	* *	* ** *
ATKNAT3	RKQAGLDPGTTSVLKAWQSHSK--	NPYPTEERARVQETGQQLQNNWEE	CRFRNWHSS
ATKNAT4	RKQAGLDPGTTSVLKAWQSHSK--	NPYPTEERARVQETGQQLQNNWEE	CRFRNWHSS
ATKNAT2	KKQKGLPRARQALLDKNVHNK--	WPYPTEGKIALSETGIDQNNWEE	CRFRHWKPS
ATBEL1	--PQRGPERATTLRAWLEEHFL--	HPYPSDVVHILAFQHGSRQVSNWEE	APNELWKPM
ATHB-1	KRQYHRTTQQRHFAIFKET----	PHPDEQOQCLFQLGIAERQKFWFQNRRTQ	HAILE
ATHB-10	KRQYHRTTQQRHFAIFKET----	PHPDEQOQCLFQLGIAERQKFWFQNRRTQ	HAILE
ATANTHOC	KRQYHRTTQQRHFAIFKET----	PHPDEQOQCLFQLGIAERQKFWFQNRRTQ	HAILE
ATHB-2	NSQKIRLKKCSAILEETFKDH----	STLNEQKQALACLGIRARQEVWFQNRRA	THIKK
ATHAT1	TCKIRLKKCSAILEETFKDH----	NTLNEQKQALACLGIRARQEVWFQNRRA	THIKK
ATHB-5	AABKPRIGVQKALEKNFEID----	NKLEPEIKVPLAQELGIERQVAVWFQNRRA	THIKK
ATHB-6	LSEKPRIGVQKALEKNFELE----	NKLEPEIKVPLAQELGIERQVAVWFQNRRA	THIKK
ATHB-3	LGEKPRIGVQKALEKNFELE----	NKLEPEIKVPLAQELGIERQVAVWFQNRRA	THIKK
ATHB-7	NKNNQRENEQKALEKNFESE----	TRLEEKVQVLAELGIERQVAVWFQNRRA	THIKK
ATHB12	KSMNQRENEQKALEKNFESE----	TRLEEKVQVLAELGIERQVAVWFQNRRA	THIKK
ATHAT3	SSSSACQDQKTOPLYSPOEN----	QYPDKAKESLAELQTVQNNWEKRRWSINSKP	
ATHAT4	SSSSACQDQKTOPLYSPOEN----	QYPDKAKESLAELQTVQNNWEKRRWSINSKP	
ATERH	GRQMEPRNAENIQVFAET----	ELPSKAVDFLANELSDPEFNKWEKRRWSINSKP	
ATLUMININ	GKPRDILNPKAKYLNAVFAIK----	DAISHESRELAELQTVQNNWEKRRWSINSKP	
ATMUSHEL	QTSTRWTETLQKIKELYNNAIRSPADQITAF	RQFGHLEGQVYWFQNRRA	THIKK

FIG. 8

ES 2 308 869 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Politécnica de Valencia

5 <120> Gen OCP3

<130> P-INCI-N-05-0039

10 <160> 1

<170> PatentIn version 3.2

15 <210> 1

<211> 354

<212> PRT

20 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

25	Met	Ile	Lys	Ala	Met	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala	Gly	Val	Val	Ser	His	Leu
	1				5					10					15	
	His	Pro	Pro	Ser	Phe	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Val	Asn	Arg	Val
				20					25					30		
30	Leu	Phe	Arg	Asn	Arg	Asn	Ala	Ser	Pro	Cys	Gly	Leu	Ser	Leu	Pro	Ile
			35					40					45			
35	Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Ser	Val	Leu	Val	Phe	Ala	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg
		50					55					60				
40	Lys	Gly	Phe	Val	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Lys	Lys	Asn	Lys	Lys	
	65					70				75						80
	Lys	Ser	Leu	Asp	Gly	Ala	Asp	Asn	Gly	Gly	Gly	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp
				85					90					95		
45	Pro	Phe	Glu	Ala	Leu	Phe	Asn	Leu	Leu	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Asp
				100				105					110			
50	Asn	Ser	Asp	Asp	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	Ala
			115					120					125			
	Asp	Glu	Leu	Ala	Arg	Ala	Leu	Gly	Val	Gly	Asp	Asp	Val	Asp	Asp	Ile
		130					135					140				
55	Asp	Leu	Phe	Gly	Ser	Val	Thr	Gly	Asp	Val	Asp	Val	Asp	Val	Asp	Asn
	145					150					155					160
60	Asp	Asp	Asp	Asp	Asn	Asp	Asp	Asp	Asp	Asn	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
					165					170					175	
	Ser	Glu	Glu	Asp	Glu	Arg	Pro	Thr	Lys	Leu	Lys	Asn	Trp	Gln	Leu	Lys
65				180					185					190		
	Arg	Leu	Ala	Tyr	Ala	Leu	Lys	Ala	Gly	Arg	Arg	Lys	Thr	Ser	Ile	Lys

ES 2 308 869 B2

	195		200		205															
5	Asn	Leu	Ala	Ala	Glu	Val	Cys	Leu	Asp	Arg	Ala	Tyr	Val	Leu	Glu	Leu				
		210					215					220								
10	Leu	Arg	Asp	Pro	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Met	Leu	Ser	Ala	Thr	Leu	Pro				
	225					230					235					240				
15	Asp	Glu	Lys	Pro	Pro	Val	Ala	Ala	Pro	Glu	Asn	Ser	Ser	Pro	Asp	Pro				
					245					250					255					
20	Ser	Pro	Val	Glu	Ser	Leu	Ser	Ala	Glu	Asp	Val	Val	Val	Glu	Pro	Lys				
				260					265					270						
25	Glu	Lys	Val	Lys	Asp	Glu	Ala	Val	His	Val	Met	Gln	Gln	Arg	Trp	Ser				
			275					280					285							
30	Ala	Gln	Lys	Arg	Val	Lys	Lys	Ala	His	Ile	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Val				
		290					295					300								
35	Tyr	Arg	Arg	Ser	Lys	Arg	Pro	Thr	Asn	Ala	Val	Val	Ser	Ser	Ile	Val				
	305					310					315					320				
40	Gln	Val	Thr	Asn	Leu	Pro	Arg	Lys	Arg	Val	Leu	Lys	Trp	Phe	Glu	Asp				
					325					330					335					
45	Lys	Arg	Ala	Glu	Asp	Gly	Val	Pro	Asp	Lys	Arg	Ala	Pro	Tyr	Gln	Ala				
				340					345					350						
50	Pro	Val																		
55																				
60																				
65																				



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 308 869

⑫ Nº de solicitud: 200501035

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **22.04.2005**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **C12N 15/29** (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DATABASE UNIPROT [Online] 01 mar 2003 (01-03-2003) Hypothetical protein Atg11270(Atg11270). Retrieved from EBI, Accesion nº Q8H0V5.	1-11
A		
X	EP 10333405 A2 (CERES INCORPORATED) 06.09.2000	1-11
A	BERROCAL-LOBO M., et al., "Constitutive expression of Ethylene-Response -Factor1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi" The Plant Journal (2002) 29(1), 23-32.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

22.10.2008

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1