(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 267 390**

(21) Número de solicitud: 200501563

(51) Int. Cl.:
C12N 15/29 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **16.06.2005**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2007**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **01.03.2007**

(71) Solicitante/s: **Universidad Politécnica de Valencia**
CTT-Edif. I1 y I2 - Camino de Vera, s/n
46022 Valencia, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

(72) Inventor/es: **Gil Morrio, María José;**
Coego González, Berto y
Vera Vera, Pablo

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Aislamiento y caracterización del mutante *csb3-1* de *Arabidopsis thaliana*, y su uso como regulador de la resistencia en plantas a enfermedades producidas por patógenos biotróficos.**

(57) Resumen:
Aislamiento y caracterización del mutante *csb3-1* de *Arabidopsis thaliana*, y su uso como regulador de la resistencia en plantas a enfermedades producidas por patógenos biotróficos.
La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la biotecnología vegetal, y en concreto se refiere a la identificación y caracterización del mutante *csb3-1* de *Arabidopsis thaliana*, así como su función en la regulación de la resistencia a enfermedades producidas por patógenos biotróficos, y sus aplicaciones en la generación de plantas resistentes a este tipo de patógenos.

ES 2 267 390 A1

DESCRIPCIÓN

Aislamiento y caracterización del mutante *csb3-1* de *Arabidopsis thaliana*, y su uso como regulador de la resistencia en plantas a enfermedades producidas por patógenos biotróficos.

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la biotecnología vegetal, y en concreto se refiere a la identificación y caracterización del mutante *csb3-1* de *Arabidopsis thaliana*, así como su función en la regulación de la resistencia a enfermedades producidas por patógenos biotróficos, y sus aplicaciones en la generación de plantas resistentes a este tipo de patógenos.

Estado de la técnica

Las plantas reaccionan al ataque microbiano con una serie de defensas inducibles que están integradas por un complejo sistema de señalización. En la última década, se ha logrado un avance notable en la comprensión de los mecanismos moleculares con los cuales se defienden las plantas del ataque microbiano, mediante la clonación y la caracterización de factores de resistencia a la enfermedad de las plantas que reconocen la presencia de factores de avirulencia de patógenos que desencadenan la denominada respuesta hipersensible (RH) (Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411, 826-833.). La RH puede confinar al patógeno invasor, previniendo así la diseminación de la infección (Agrios, G.N. (1988). Plant Pathology. Academic Press, London, U.K.). En la mayoría de los casos, el inicio de la RH produce la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Ross, A.F. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. Virology 14, 340-358.), una respuesta defensiva que proporciona una protección de larga duración en toda la planta frente a un amplio espectro de patógenos (Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. Ann. Rev. Phytopathol. 42, 185-209.). El ácido salicílico (SA) es una molécula señal esencial que desempeña un papel central en la inducción de la SAR (Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science 266, 1247-1250.). Numerosas plantas mutantes implicadas en la acumulación o percepción de SA muestran incremento de la susceptibilidad frente a patógenos biotróficos, mientras que los mutantes que producen un exceso de SA presentan un incremento de la resistencia. En particular, se han aislado varios mutantes de *Arabidopsis thaliana* que son incapaces de activar las respuestas defensivas dependientes de SA (Durrant y Dong, 2004). Los mutantes *eds16/sid2* (*enhanced disease susceptibility16 [incremento de la susceptibilidad a la enfermedad 16]/salycilic acid induction deficient2 [deficiente a la inducción por ácido salicílico 2]*) y *eds5/sid1* (Rogers, E.E., and Ausubel, F.M. (1997). Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in PR-1 gene expression. Plant Cell 9, 305-316.; Nawrath, C., and Metraux, J.P. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. Plant Cell 11, 1393-1404; Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature 414, 562-565.) no acumulan SA tras la inoculación con patógenos virulentos y avirulentos. *SID2* codifica para una supuesta isocorismato sintasa localizada en el cloroplasto (Wildermuth *et al.*, 2001), mientras que *EDS5* codifica para una proteína asociada a la membrana y localizada en el cloroplasto que muestra homología con transportadores MATE (extrusión de toxinas y múltiples fármacos) (Nawrath *et al.*, 2002). Estos hallazgos demuestran la existencia de una ruta de síntesis de SA localizada en el cloroplasto y revelaron la importancia de este orgánulo en aspectos criticos de mediación / control de la respuesta defensiva de las plantas (Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. Curr Opin Plant Biol 6, 365-371.). De hecho, las mutaciones en varios genes que codifican para proteínas localizadas en el cloroplasto dan como resultado una señalización defectuosa de SA (Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E.J., and Klessig, D.F. (2001). A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 98, 9448-9453.; De Leon, I.P., Sanz, A., Hamberg, M., and Castresana, C. (2002). Involvement of the Arabidopsis alpha-DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. Plant J. 29, 61-62.; Slaymaker, D.H., Navarre, D.A., Clark, D., del Pozo, O., Martin, G.B., and Klessig, D.F. (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 11640-11645.; Ishikawa, A., Okamoto, H., Iwasaki, Y., and Asahi, T. (2001). A deficiency of coproporphyrinogen III oxidase causes lesion formation in Arabidopsis. Plant J. 27, 89-99.; Mach, J.M., Castillo, A.R., Hoogstraten, R., and Greenberg, J.T. (2001). The Arabidopsis- accelerated cell death gene ACD2 encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 98, 771- 776.). Además, se ha implicado una señal derivada del cloroplasto en el control del SA y la respuesta defensiva activada por patógenos que depende de la presencia de luz o un cloroplasto funcional fotosintético (Genoud, T., Buchala, A. J., Chua, N-H. and Métraux, J-P. (2002). Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in Arabidopsis. Plant J. 31, 87-95.). Además, los mutantes *eds1* y *pad4* (*phytoalexin deficient4 [deficiente en fitoalexina 4]*) bloquean la biosíntesis de SA desencadenada por la infección con patógenos virulentos (Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., and Parker, J.E. (2001). Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. EMBO J. 20, 5400-5411.; Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., and Glazebrook, J. (1999). *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13583-13588.) y también la que se observa que se produce en diferentes mutantes con resistencia a la enfermedad (Jirage, D., Zhou, N., Cooper, B., Clarke, J.D., Dong, X., and Glazebrook, J. (2001). Constitutive salicylic acid-dependent signaling in cpr1 and cpr6 mutants requires PAD4. Plant J. 26, 395-407.; Clarke, J.D., Aarts, N., Feys, B.J., Dong, X., and Parker, J.E. (2001). Constitutive disease resistance requires EDS1 in the Arabidopsis mutants cpr1 and cpr6 and is partially EDS1-dependent in cpr5. Plant J. 26, 409-420.). Se requieren EDS1 y PAD4 para la resistencia

conferida por un subconjunto de genes *R* (es decir, TIR-NB-LRR). Ambas proteínas tienen homología con las lipasas y ambas actúan después del extremo 5' de SID2 y EDS5 en la regulación de la síntesis de SA (Glazebrook, J., Rogers, E.E., and Ausubel, F.M. (1997). Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. Annu. Rev. Genet. 31, 547-569.; Jirage *et al.*, 1999; Feys *et al.*, 2001; Nawrath, C., Heck, S., Parinthawong, N., and Métraux, J-P. (2002). EDS5, an Essential Component of Salicylic Acid-Dependent Signaling for Disease Resistance in Arabidopsis, Is a Member of the MATE Transporter Family. Plant Cell 14, 275- 286.). La proteína de repetición de anquirina NPR1 (que no expresa PR-1) se identificó inicialmente en *Arabidopsis* a través de una selección genética de mutantes comprometidos en la SAR (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.). NPR-1 es un regulador esencial de SAR (Dong, X. (2004) NPR1, all things considered. Current Opinion in Plant Biology, 7, 547-552.) y de la ruta de defensa independiente de SAR, ISR (respuesta sistémica inducida; Pieterse, C.M., and Van Loon, L.C. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Curr. Opin. Plant Biol. 7, 456-464.). Con el tratamiento con SA y el desequilibrio redox del cognato, NPR1 se transloca al núcleo donde actúa como modulador de la expresión del gen *PR* a través de una interacción selectiva con miembros de la subclase TGA de la familia de cierre ("zipper") de leucinas básicas de factores de transcripción (Dong, 2004). Además de *npr1*, se han identificado otros mutantes comprometidos en la SAR. Una lista no exhaustiva incluye *dir1* (*defective in induced resistance*1 [deficiente en resistencia inducida 1]; Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., and Cameron, R.K. (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. Nature 419, 399-403.), que lleva una mutación en un gen que codifica para una proteína con similitud de secuencia con las proteínas de transferencia de lípidos y apunta en dirección a una señal basada en lípidos móviles que media la SAR. Asimismo, el mutante *dth9* (*detachment9 [desprendimiento 9]*) difiere de *npr1* en que la expresión de *PR* está inalterada. El hecho de que el tratamiento con SA no restablezca la resistencia en las plantas *dth9* susceptibles a la enfermedad, coloca a DTH9 por detrás de 3' de SA en una ruta paralela de NPR1. Además de esto, se han llevado a cabo varias selecciones genéticas para buscar supresores de un *npr1* que permite la identificación de componentes novedosos de la ruta de señalización de SAR, tales como SNI1, SNC1, SON1 o SSI2 entre otros (Kachroo *et al.*, 2001; Li, X., Clarke, J.D., Zhang, Y., and Dong, X. (2001). Activation of an EDS 1-mediated R-gene pathway in the snc1 mutant leads to constitutive, NPR1 independent pathogen resistance. Mol. Plant Microbe Interact. 14, 1131-1139; Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y., and Dong, X. (1999). Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of npr1-1. Cell 98, 329-339.; Kim, H.S., and Delaney, T.P. (2002). Arabidopsis SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. Plant Cell 14, 1469-1482.; Shah, J., Kachroo, P., and Klessig, D.F. (1999). The Arabidopsis ssi1 mutation restores pathogenesis-related gene expression in npr1 plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. Plant Cell 11, 191-206.; Nandi, A., Welti, R., and Shah, J. (2004). The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene suppressor of fatty acid desaturase deficiency is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. Plant Cell 16, 465-477.; Zhang, Y., Goritschnig, S., Dong, X., and Li, X. (2003). A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. Plant Cell 15, 2636-2646.). Curiosamente, los mutantes *snc1* (*suppressor of npr1-1, constitutive] [supresor de npr1-1, constitutivo 1]*), *sni1* (*suppressor of npr1 inducible] [supresor de npr1 inducible 1]*) y *ssi2* (*suppressor of SA insensitivity2 [supresor de insensibilidad de SA 2]*) muestran expresión de *PR* constitutiva y aumento de la resistencia frente a patógenos biotróficos. Por el contrario, el mutante *son1* (*suppressor of nim1-1 [supresor de nim1-1]*) aporta SAR sin inducción del gen *PR* y define un nuevo fenómeno que se ha denominado resistencia independiente de SAR o ISR (Hammond-Kosack, K.E., and Parker, J.E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Curr. Opin. Biotechnol. 14, 177-193.).

Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención lo constituye el aislamiento y la caracterización de un mutante del gen *CSB3* (SEC. ID.NO. 2) de *Arabidopsis thaliana*, denominado *csb3-1* (derivado de *constitutive subtilisin3 [subtilisina constitutiva 3]*) (SEC. ID. NO.1) con incremento de la resistencia a patógenos biotróficos y desregulada en la expresión de un promotor génico caracterizado previamente que controla la expresión de una proteasa subtilisina inducible por patógeno (P69C). *CSB3* se aisló mediante clonación basada en el mapeo y se demostró que codifica para una 1-hidroxi-2-metil-2-butenil-4-difosfato sintasa, una enzima que controla una de las etapas terminales de la biosíntesis de difosfato de isopentenilo (IPP) a través de la ruta de 4-fosfato de 2-C-metil-D-eritritol (MEP) que se produce en el cloroplasto de las plantas superiores. A través del análisis de epistasis con otros mutantes caracterizados relacionados con la defensa, junto con el aislamiento y la caracterización de supresores extragénicos del mutante *csb3* y la complementación farmacológica del fenotipo de incremento de resistencia de plantas *csb3*, se propone que CSB3 controla los aspectos críticos de la ruta de resistencia a la enfermedad mediada por SA frente a patógenos biotróficos.

Otro objeto de la presente invención consiste en la utilización del alelo mutante *csb3-1* en especies vegetales de interés agronómico, para la obtención de variedades resistentes a enfermedades producidas por patógenos biotróficos, inhibiendo el gen CSB3 o la actividad de la proteína por él codificada con el fin de incrementar la síntesis y acumulación de ácido salicílico y por ende de la resistencia a patógenos biotróficos.

Aislamiento del mutante csb3

El gen *P69C* codifica para una proteasa similar a la subtilisina, originalmente identificada en las plantas de tomate (Jorda, L., and Vera, P. (2000). Local and systemic induction of two defenserelated subtilisin-like protease promoters

in transgenic Arabidopsis plants. Luciferin induction of PR gene expression. Plant Physiol. 124, 1049-1058.). Las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen una región de 2,5 kb del promotor 5' de *P69C* fusionada al gen indicador de ®-glucuronidasa (*GUS*) revela una rápida activación transcripcional de este gen mediante SA y durante el transcurso de interacciones compatibles e incompatibles con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) (Jordá *et al.*, 2000). Se observa expresión inducida en las hojas locales inoculadas (es decir, tras inoculación con *Pst* DC3000 que lleva *avrRpm1* (*Pst* DC3000 *avrRpm1*)), así como en hojas distales no inoculadas de la misma planta. Curiosamente, la expresión inducida en las hojas inoculadas tiene lugar a una distancia de la zona donde se ejecuta la RH. La expresión del transgén *P69C-GUS* se produce en puntos distribuidos a todo lo largo de la lámina de la hoja de tanto las hojas locales como las distales, tal como se visualiza mediante la deposición del azul añil derivado de la X-gluc utilizada como sustrato. Este patrón de expresión es distinto al observado para otros genes regulados por SA, tales como *PR-1*, cuya expresión inducida es sumamente delimitada y concéntrica a los tejidos que rodean la lesión de RH (Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, S., Klessig, D.F., and Dong, X. (1994). A mutation in Arabidopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. Plant Cell 6, 1845-1857.).

Con el fin de identificar las señales y los mecanismos implicados en la ruta que conduce a la distinta activación del promotor de *P69C* y de estudiar el impacto que esta ruta puede tener sobre la resistencia a la enfermedad, la investigación se dirigió a la búsqueda de mutantes utilizando plantas transgénicas de *Arabidopsis* que albergan el constructo génico *P69C-GUS*. La idea fue que mediante la selección de los mutantes que muestran expresión del gen indicador en plantas sanas no inoculadas, se podrían identificar las mutaciones que afectan a la respuesta defensiva. Para ello, se sometió a mutagénesis una de las líneas transgénicas homocigóticas que contienen una única inserción de *P69C-GUS* con metanosulfato de etilo (EMS) y se seleccionaron aproximadamente 12800 semillas M2 para individuos con actividad GUS elevada de manera constitutiva. Estos mutantes se denominaron *csb* (constitutive subtilisin [subtilisina constitutiva]). Se seleccionó un mutante con gran expresión de *GUS*, denominado *csb3*, el cual se describe detalladamente en la presente invención.

Las plantas *csb3* pueden distinguirse de las plantas salvajes, debido a su característico fenotipo atrofiado y hojas rizadas (figura 1A). Se llevó a cabo tinción histoquímica para determinar la actividad GUS, para investigar el patrón de expresión constitutiva de gen indicador en las plantas *csb3*. Tal como se muestra en las figuras 1B-C, no se detectó actividad GUS en los plantones salvajes originales. Por el contrario, los plantones csb3 mostraron tinción de GUS en los cotiledones y una expresión más pronunciada de actividad GUS en hojas en roseta de plantas con crecimiento completo.

Como la aplicación local de SA induce la expresión de *P69C-GUS* en plantas salvajes de *Arabidopsis* (Jordá *et al.*, 2000), se estableció la hipótesis de que la acumulación de SA podría estar aumentada en las plantas *csb3*. En un primer lugar se estableció la expresión de varios genes inducibles por SA (*PR-1*, *PR-2* y *GST6*) en plantas *csb3*. Los análisis tipo Northern mostrados en la figura 1D revelaron que la expresión de los genes seleccionados estaba en todos los casos incrementada en plantas *csb3* intactas, pero no en plantas salvajes, apuntando por tanto en dirección a una activación constitutiva de la señalización dependiente de SA en el mutante csb3. Por el contrario, la expresión del gen marcador de jasmonato / etileno, *PDF1.2*, no estaba alterado en las plantas *csb3* (figura 1D).

El hecho de que la expresión génica regulada por SA está activada en plantas *csb3* intactas sugirió una alteración de la acumulación de SA en las plantas *csb3*. Por tanto, se examinaron los niveles de SA libre y de glucósido-salicilato conjugado (SAG) en tejidos de hoja de plantas *csb3* y salvajes (figura 1E). En las hojas no inoculadas de plantas *csb3*, se observó un aumento de ocho veces en el contenido en SAG cuando se comparaba con las plantas salvajes. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de SA libre. Sin embargo, en el tejido de hoja infectada, a los 3 días después de la inoculación (d.p.i) con *Pst* DC3000, las cantidades de SA libre aumentaron once veces en las plantas *csb3* mientras que sólo aumentaron tres veces en las plantas salvajes. Se observaron aumentos proporcionales similares en la cantidad de SAG entre plantas *csb3* y salvajes tras la inoculación (figura 1E). Este hallazgo sugiere que la mutación *csb3* no sólo confiere un incremento de la acumulación de SA en condiciones de reposo, sino también hace que las plantas tiendan más a aumentar la síntesis y la acumulación de esta molécula tras la infección.

Para analizar el patrón de herencia de la mutación *csb3*, se sometieron a retrocruzamiento plantas *csb3/csb3* con plantas salvajes *CSB3/CSB3* que contienen el transgén *P69C-GUS* y se analizó la progenie resultante F1 y F2 para determinar la tinción de GUS. Como la expresión constitutiva de GUS estaba ausente en todas las plantas F1 analizadas, se concluyó que la expresión constitutiva de GUS mediada por *csb3* se heredaba como un carácter recesivo. En las plantas F2, la expresión estaba presente en 67 de 240 plantas (3:1, que no expresan: que expresan de manera constitutiva; $\cdot_2$= 0,4, 0,1>P>0,5), lo que apoya la conclusión de que *csb3* es una mutación recesiva y lo que indica que un único locus es responsable del fenotipo *csb3*.

El mutante csb3 tiene un incremento de la resistencia frente a patógenos biotróficos pero no frente a necrotóficos

Con el fin de determinar si existe una relación entre la ruta de señales que median la activación de *P69C-GUS* y que median la resistencia a la enfermedad, se analizó la respuesta de plantas *csb3* y salvajes frente a diferentes patógenos que generan enfermedad en *Arabidopsis*. La respuesta de plantas *csb3* frente al oomiceto biotrófico obligatorio *Hyaloperonospora parasitica* comparado con la respuesta de plantas salvajes se muestra en la figura 2A-B. Se inocularon 25 plantas *csb3*, así como 25 plantas salvajes con el aislado de *H. parasitica* NOCO (10^5 conidiosporas/ml), que es virulento sobre *Arabidopsis* Col-0. Se sometió a ensayo el crecimiento del patógeno mediante la observación directa de hifas teñidas en hojas infectadas (figura 2A) y mediante el recuento de los conidios producidos sobre hojas

infectadas (figura 2B). Ambas mediciones revelaron una diferencia significativa en el crecimiento de patógenos entre plantas salvajes y *csb3*. Mientras las plantas salvajes tuvieron una fuerte colonización por los oomicetos y permitieron su ciclo de vida completo (formación de oosporas sexuales y conidios asexuales en los conidióforos), las plantas *csb3* inhibieron drásticamente el crecimiento de este patógeno. Esto indica que la resistencia frente a este patógeno biotrófico se incrementó drásticamente o se bloqueó la susceptibilidad como consecuencia de la mutación en el locus *CSB3*.

También se expusieron las plantas salvajes y *csb3* al patógeno bacteriano virulento *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), otro patógeno biotrófico de *Arabidopsis*. Tras la inoculación, la velocidad de crecimiento del patógeno se controló en las hojas infectadas. Las curvas de crecimiento resultantes se muestran en la figura 2C. El número de unidades formadoras de colonias de *Pst* DC3000 detectadas en plantas *csb3* fue de 30 a 60 veces inferior al número detectado en las plantas salvajes tras 3 ó 5 días de crecimiento. Por tanto, las plantas *csb3* muestran también incremento de la resistencia frente a este patógeno bacteriano.

La susceptibilidad de las plantas *csb3* frente a patógenos se analizó adicionalmente utilizando *Plectospharella cucumerina*, un patógeno necrotrófico de *Arabidopsis*. La infección de plantas salvajes por *P. cucumerina* conduce a una fuerte degradación del tejido de la hoja, manifestada como lesiones extensas que aumentan de diámetro a medida que la infección progresa a lo largo de la hoja inoculada. No se observaron diferencias en la extensión de la lesión entre las plantas *csb3* y salvajes (figura 2D). Para determinar si la mutación *csb3* podía provocar cambios en la susceptibilidad frente a otro patógeno necrotrófico, se inocularon plantas *csb3* y salvajes con *Botrytis cinerea*. La enfermedad se puntuó entre 5 y 10 días después de la inoculación mediante el seguimiento de la extensión de la necrosis y la muerte que aparece en las hojas inoculadas. Tanto las plantas salvajes como las plantas *csb3* eran sumamente susceptibles a *Botrytis*, y todas las plantas mostraban necrosis acompañada por proliferación extensa de micelios fúngicos (figuras 2E y 2F). Por tanto, la mutación *csb3* parecía no afectar a la susceptibilidad de la planta frente a patógenos necrotróficos. Basándose en el fenotipo del mutante recesivo *csb3*, podría establecerse la hipótesis de que CSB3 podría regular negativamente determinados aspectos de la respuesta defensiva frente a patógenos biotróficos.

Respuesta de dobles mutantes csb3 frente a Pst DC3000

Para proporcionar perspectivas adicionales de la señalización activada por *csb3*, se generó una serie de dobles mutantes entre *csb3* y diferentes mutantes con afectación en la ruta relacionada con SA. Se investigó la respuesta de resistencia frente a *Pst* DC3000 para todos estos mutantes (figura 3).

La mutación *pad4* compromete la acumulación de SA desencadenada por la infección por *P. syringae* virulento (Feys *et al.*, 2001; Jirage *et al.*, 1999) y por tanto, suprime la acumulación de SA alcanzada en otros mutantes resistentes a patógenos biotróficos (Jirage *et al.*, 2001). Tal como se muestra en las figuras 3A y 3B, tanto el incremento de la resistencia frente a *Pst* DC3000, así como la expresión constitutiva del gen *PR-1* inducible por SA conferida por la mutación *csb3* están suprimidas en las plantas dobles mutantes *csb3 pad4*. Estos datos muestran que se requiere completamente PAD4 para la señalización en plantas *csb3*.

Los mutantes *sid2* y *eds5* de *Arabidopsis* presentan alteración en la síntesis y acumulación de SA que se produce en el cloroplasto a través de las rutas del corismato e isocorismato y ambas plantas mutantes muestran aumento de la susceptibilidad frente a los patógenos (Nawrath y Métraux, 1999; Wildermuth *et al.*, 2001). En las plantas *csb3 sid2*, así como plantas *csb3 eds5*, la resistencia frente a *Pst* DC3000 conferida por *csb3* en el aislamiento está notablemente reducida (figura 3A). Por tanto, la expresión constitutiva del gen marcador *PR-1* observada en plantas *csb3* estaba bloqueada en *csb3 sid2* y en un grado menor también en plantas *csb3 eds5* (figura 3B). Por tanto, el incremento de la resistencia de las plantas *csb3* depende de la síntesis de SA que tiene lugar en el cloroplasto mediante la acción de SID2 y EDS5.

Para ampliar adicionalmente nuestra comprensión del papel de SA para el incremento de la resistencia de las plantas *csb3*, el transgén *NahG* se sometió a introgresión en plantas *csb3*. *NahG* codifica para una salicilato hidroxilasa que bloquea la acumulación de SA en el citosol mediante degradación de SA a catecol (Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science 266, 1247-1250). En las plantas *csb3 NahG*, se suprime de nuevo la resistencia aumentada conferida por la mutación *csb3* y se impone la hipersusceptibilidad de *NahG* frente a *Pst* DC3000 (figura 3A). De manera similar, desaparece la expresión constitutiva del gen *PR-1* cuando el transgén *NahG* está presente (figura 3B).

El mutante *npr1* se identificó por el aumento de su susceptibilidad frente a patógenos biotróficos y su incapacidad para organizar una respuesta SAR o expresar *PR-1* en la respuesta frente al tratamiento con SA (Cao *et al.*, 1997). Se ha mostrado que NPR1 desempeña un papel clave en la mediación de muchas respuestas defensivas (Dong, 2004). Curiosamente, las plantas *csb3 npr1* siguieron siendo tan susceptibles a *Pst* DC3000 como las plantas *npr1* (figura 3A) y la expresión del gen *PR-1* también estaba inhibida (figura 3B). Esto indica que la resistencia mediada por SA de *csb3* requiere una proteína funcional NPR1. Otro mutante comprometido con la SAR es *dth9*. Sin embargo, a diferencia de las plantas *npr1*, las plantas *dth9* siguen conservando la capacidad para expresar los genes *PR* en respuesta a SA o al ataque patogénico (Mayda, E., Mauch-Mani, B., and Vera, P. (2000). Arabidopsis dth9 mutation identifies a gene involved in regulating disease susceptibility without affecting salicylic acid-dependent responses. Plant Cell 12, 2119-2128.). De nuevo, las plantas dobles mutantes *csb3 dth9* mostraron el incremento de la susceptibilidad frente a *Pst*

DC3000 atribuible a la mutación *dth9* (figura 3A), pero a diferencia de *npr1*, la expresión del gen marcador *PR-1* atribuible a la mutación *csb3* se mantiene intacta (figura 3B), indicando así que la resistencia de *csb3* también depende de DTH9.

La expresión constitutiva de actividad GUS, dirigida por el promotor de *P69C* tal como se observa en plantas *csb3*, también está suprimida en todos los dobles mutantes generados, excepto *csb3 dth9*, y se ejemplifica en la figura 3C para las plantas *csb3 NahG*. Otro mutante interesante analizado por epistasis fue *cpr1*. Las plantas *cpr1* son más resistentes a *Pst* DC3000, tienen niveles elevados de SA, muestran expresión constitutiva del gen *PR-1* y también muestran una tendencia de crecimiento anómala (Bowling *et al.*, 1994). Por tanto, *cpr1* comparte con *csb3* varios aspectos de resistencia a la enfermedad y tamaño de crecimiento. Curiosamente, cuando la mutación *cpr1* se sometió a introgresión en el resto ("background") *csb3*, las plantas dobles mutantes *csb3 cpr1* resultantes mostraban efectos aditivos que dieron como resultado un fenotipo extremadamente enano. Las plantas dobles mutantes homocigóticas nunca alcanzaron la fase reproductiva y, por tanto, tenían que propagarse en estado heterocigótico. Por tanto, el fenotipo del mutante *csb3 cpr1* podria sugerir que la mutación *csb3* y la mutación *cpr1* contribuyen a su característico aumento de la acumulación de SA y respectivo fenotipo de incremento de la resistencia a través de rutas independientes después del extremo 3' de acumulación de SA.

Todas estas observaciones refuerzan la consideración de que la síntesis y la percepción de SA son fundamentales para la resistencia asociada a *csb3*.

Aislamiento de supresores de csb3

Para elucidar adicionalmente el papel funcional de *csb3* en la respuesta defensiva de la planta, se llevó a cabo una búsqueda de supresores de *csb3* mediante la selección de mutantes que carecen de fenotipo de incremento de la resistencia conferido por la mutación *csb3*. La identificación de supresores del fenotipo *csb3* con una reversión correspondiente en la respuesta de resistencia indicaría que el papel de CSB3 en la participación a la resistencia mediada por SA está bajo estricto control genético. Por tanto, las semillas *csb3* homocigóticas volvieron a someterse a mutagénesis con EMS y aproximadamente 10000 semillas M2 se hicieron crecer y se seleccionaron para identificar individuos que ya no mostraban el incremento de la resistencia frente a *Pst* DC3000 atribuible a la mutación *csb3*. Esta selección permitió el aislamiento de cuatro mutantes *scs* (supresores de *csb3*) (concretamente *scs2*, *scs4*, *scs9* y *scs11*; figura 4). Los cuatro dobles mutantes *scs csb3* identificados han perdido el fenotipo enano morfológico distinguible de *csb3* y son similares a las plantas salvajes en cuanto a la arquitectura y la tendencia de crecimiento de la planta (figura 4A). Por tanto, la expresión constitutiva del gen *P69C-GUS* (figura 4A) y la del gen *PR-1*, ambas atribuibles a la mutación *csb3*, estaban suprimidas en los dobles mutantes *scs csb3*. Además, el registro comparativo de la velocidad de crecimiento de *Pst* DC3000 en hojas infectadas de plantas salvajes, *csb3* y *scs csb3* reveló que los mutantes *scs csb3* han perdido el incremento de la resistencia frente a *Pst* DC3000 que era característico del mutante *csb3* original (figuras 4B-C). En este caso, la resistencia frente a *Pst* DC3000 alcanzada en plantas *scs2 csb3* y *scs11 csb3* es similar a la observada en plantas salvajes, apoyando un título de crecimiento bacteriano de más de 8 a 40 veces el observado en plantas *csb3* (figura 4B). La pérdida del incremento de la resistencia conferido por la mutación *csb3* es incluso más llamativa en las plantas *scs4 csb3* y *scs9 csb3*. Las plantas *scs4 csb3* y *scs9 csb3* se vuelven mucho más susceptibles a *Pst* DC3000 que las plantas salvajes y permiten un aumento de más de 100 veces en el crecimiento bacteriano cuando se compara con las plantas *csb3* (figura 4C). La hipersusceptibilidad de las plantas *scs9 csb3* a *Pst* DC3000 fue incluso superior a la observada en plantas *npr1* y comparable a la registrada para las plantas *dth9* cuando se realizó un experimento lado a lado; sin embargo, ninguna de las mutaciones *scs* son alélicas con respecto a *npr1*, *dth9* o cualquiera de los mutantes mencionados previamente. Además, los análisis genéticos indican que las cuatro mutaciones *scs* no son alélicas entre ellas, son extragénicas a *csb3*, y el fenotipo conferido por cada una de las mutaciones *scs* se mantiene incluso en ausencia de la mutación *csb3*.

En resumen, estos resultados refuerzan la hipótesis de que CSB3 es un componente importante de la ruta de resistencia a la enfermedad mediada por SA en *Arabidopsis* y su papel en la ruta está controlado adicionalmente por los productos génicos de *SCS*.

Clonación basada en el mapeo de CSB3

Para definir la posición de *CSB3* en el mapa cromosómico, el mutante *csb3*, que está en un resto Col-0, se cruzó con plantas Landsberg *erecta* (L*er*) salvajes. Las plantas mutantes *csb3* homocigóticas se identificaron entre la progenie F2 por su fenotipo morfológico característico. Se examinó la población de mapeo de F2 seleccionada para determinar la segregación de marcadores moleculares basados en PCR. Para el mapeo inicial, se probaron 38 plantas F2 con marcadores de polimorfismo de longitud de secuencia única (SSLPS) de cada uno de los cinco cromosomas (Bell, C.J., and Ecker, J.R. (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of Arabidopsis. Genomics 19, 137-144.). El marcador CIW10 en el cromosoma 5 mostró cosegregación con el fenotipo *csb3*. El análisis adicional de esta región mostró que la mutación se localizaba entre los marcadores nga129 y MBK-5, que están separados por 15 cM. Para limitar la región en la que estaba localizado *CSB3*, se utilizó la base de datos de inserciones / deleciones grandes de Cereon Genomics para diseñar marcadores SSLP. Después de seleccionar 748 plantas F2, se limitó *CSB3* a dos clones BAC (MUF9 y MUP24) que comprenden una región de 66 kb que contenía 21 marcos de lectura abiertos (ORF) (figura 5A). La región completa de cada uno de estos genes se amplificó a partir de plantas *csb3* y se determinaron las secuencias de los productos de PCR. La secuencia correspondiente al gen *At5g60600* se identificó como la única en mostrar una única mutación puntual. Este gen contiene 20 exones y la mutación *csb3* (a partir de ahora *csb3-1*)

representaba una transición de G a A en la cadena codificante del exón 19 que conduce a un cambio de aminoácidos de Gly a Asp. En las figuras 5A-C, se facilita una visión general de la estrategia de mapeo y la estructura génica.

CSB3 es un gen de única copia que codifica para la 1-hidroxi-2-metil-2-butenil-4-difosfato [HMBPP] sintasa (HDS) localizada en el cloroplasto que cataliza la formación de HMBPP a partir de 2,4-ciclodifosfato de 2-C-metil-D-eritritol (MEcPP) mediante un mecanismo todavía desconocido (Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D., and Rohdich, F. (2001). Studies on the nonmevalonate pathway to terpens: the role of the GcpE (IspG) protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 14837-14842.; Kollas, A.-K., Duin, E. C., Eberl, M., Altincicek, B., Hintz, M., Reichenberg, A., Henschker, D., Henne, A., Steinbrecher, J., Ostrovsky, D. N., *et al.* (2002). Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. FEBS Lett. 532, 432-436.). La enzima HDS controla una de las etapas terminales de la biosíntesis de difosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP) a través de la ruta de 4-fosfato de 2-C-metil-D-eritritol (MEP) independiente de mevalonato que se produce en el cloroplasto de las plantas superiores (figura 6). La ruta de MEP localizada en el plástido, junto con la ruta dependiente de mevalonato citosólico (MVA), se encargan de la síntesis de difosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero difosfato de dimetilalilo (DMAPP), los precursores inmediatos para la biosíntesis de isoprenoides (figura 6) (Rohmer, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. Nat. Prod. Rep. 16, 565-574.). La enzima HDS está conservada en microorganismos en los que se conoce como GCPE (Kollas *et al.*, 2002), a pesar de la diferencia con la enzima HDS de planta madura que contiene un dominio proteico interno grande que está ausente en el homólogo bacteriano (figura 5D). Este dominio adicional puede conferir distintas funciones reguladoras o catalíticas a la enzima de la planta (Querol J, Campos N, Imperial S, Boronat A, Rodríguez-Concepción M (2002). Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. FEBS Lett. 514: 343-346.). Las enzimas vegetales y microbianas muestran una región de aminoácidos sumamente conservada cercana al extremo C-terminal en la que se localiza un conjunto de residuos Cys convencionales que participan en el ensamblaje de una agrupación ("cluster") [4Fe-4S] (aminoácidos 640 a 684, figura 5D). La identificación de diferentes mutaciones en *Escherichia coli* localizadas en el interior o cerca del motivo 4Fe-4S señalan a esta región como crítica para la función enzimática (Sauret-Güeto S, Ramos-Valdivia A, Ibanez E, Boronat A, Rodríguez Concepcion M. (2003) Identification of lethal mutations in Escherichia coli genes encoding enzymes of the methylerythritolphosphate pathway. Biochem Biophys Res Commun. 307, 408-415.). Como la mutación *csb3-1* identificada está cerca de este motivo (figura 5D), puede argumentarse que la mutación introduce una alteración estructural que puede desestabilizar el plegamiento y, a su vez, la función correcta del cluster Fe-S.

Se identificó una inserción de ADN-T de *Arabidopsis* (SALK 017595) en el gen *CSB3*, en la presente invención denominada como *csb3-2* (figura 5C). Esta mutación altera *CSB3* a nivel del 16° exón. Curiosamente, las plantas heterocigóticas para esta inserción de ADN-T segregaron plantones albinos que eran mortales. Además, en una búsqueda de mutantes con afectación del desarrollo del cloroplasto, muy recientemente (Gutiérrez-Nava, M.L., Gillmor, C.S., Jiménez, L.F., Guevara-García, A., and León, P. (2004). CHLOROPLAST BIOGENESIS genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. Plant Physiol. 135, 471-482.) identificaron que el mutante *clb4* (*chloroplast biogenesis [biogénesis de cloroplasto]*) llevaba una mutación inducida por EMS en el mismo locus en el que el cambio de transición da como resultado la aparición de un codón de terminación prematuro en el exón 9 (figura 5C). Para dar uniformidad, este último alelo se denominó para la presente invención *csb3-3/clb4*. De manera similar a *csb3-2*, los plantones albinos con mutación *csb3-3/clb4* también eran mortales (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004). Es interesante observar aquí que otros mutantes de ADN-T que alteran los ORF de otros genes de la ruta de MEP (Budziszewski, G.J., *et al.* (2001). Arabidopsis genes essential for seedling viability: Isolation of insertional mutants and molecular cloning. Genetics 159, 1765-1778.) producen el mismo fenotipo albino mortal de plantones. Esto sugiere que la ruta de MEP es esencial para la planta y que el alelo *csb3-1* identificado en la presente invención es una pérdida parcial de función y no un mutante nulo.

Para confirmar que *At5g60600* se corresponde con el gen *CSB3*, se utilizó la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para introducir en las plantas *csb3-1* un ADNc que se corresponde con *At5g60600*, bajo el control del promotor 35S de CaMV (constructo *35S-CSB3*). Se generaron varias líneas transgénicas con el constructo *35SCSB3* y se estudiaron algunas de ellas detalladamente. Todas las líneas transgénicas generadas habían perdido el fenotipo morfológico característico atribuible a la mutación *csb3-1* y habían recuperado un aspecto externo natural (véase la figura 7A). Además, los transformantes perdieron la expresión constitutiva del gen *P69CGUS* (figura 7A), así como la expresión constitutiva de los genes relacionados con SA, es decir, *PR-1* y *GST6*, que era característica de las plantas *csb3-1* no transformadas (figura 7C). Además, la expresión de At5g606000 bajo el control del promotor 35S en las plantas transgénicas *csb3-1* suprime el incremento de la resistencia frente a *Pst* DC3000. En estas plantas transgénicas, la resistencia frente a *Pst* DC3000 vuelve a niveles similares a los alcanzados en plantas salvajes (figura 7B). La complementación completa de todos los aspectos diferentes del fenotipo *csb3* confirma que *At5g60600* es equivalente a *CSB3*.

La expresión de CSB3 se inhibe parcialmente por la infección por Pst DC3000.

La expresión de *CSB3* en respuesta a la infección por *P. syringae* se analizó en hojas de plantas salvajes a diferentes intervalos de tiempo tras la inoculación y en un contexto que genera una interacción compatible (es decir, tras la inoculación con *Pst* DC3000) o una incompatible (es decir, tras inocular con *Pst* DC3000 (*avrRpm1*)). Se estudió la presencia de ARNm de *CSB3* mediante RT-PCR. Estos análisis revelaron que la infección por *Pst* DC3000 que llevaba el gen de la avirulencia, gen *avrRpm1*, y por tanto, que incitaba una respuesta RH en el tejido inoculado, le

seguía una disminución marcada en el nivel de acumulación de los ARNm de *CSB3* (figura 7D). Esta reducción ya se observaba a las 24 h después de la inoculación y se mantenía posteriormente incluso después de 48 horas después de la inoculación.

De manera concomitante e inversamente correlacionada con esta reducción, el gen marcador inducible por SA, *PR-1*, estaba regulado por incremento. Se registraron resultados similares, aunque con un efecto menos intenso, en una interacción compatible tal que la que sigue a la inoculación con *Pst* DC3000 que carece de *avrRpm1* (figura 7D). Además, la expresión de CSB3 en plantas *csb3-1* también reveló una reducción de los niveles en el estado estacionario de su ARNm comparado con las plantas salvajes (figura 7D). Por tanto, la regulación por disminución de la expresión de *CSB3* tras la infección bacteriana o en el resto mutante, se correlaciona de manera inversa con la expresión inducida de *PR-1*.

La fosmidomicina complementa el incremento de la resistencia de plantas csb3-1 frente a Pst DC3000.

Un aumento en la acumulación del sustrato (MEcPP) de la enzima CSB3/HDS o de cualquiera de los productos intermedios metabólicos que preceden la acumulación de MEcPP en la ruta de MEP (figura 6) podría ser responsable del incremento de la resistencia de las plantas *csb3-1*. De manera alternativa, una disminución de la síntesis del producto (HMBPP) de la misma enzima podría comprometer la síntesis y la acumulación de los productos finales (es decir, IPP y DMAPP) (figura 6), que, a su vez, pueden comprometer la posterior biosíntesis de los diferentes isoprenoides que deben derivarse de la ruta de MEP. Esta última posibilidad también puede ser responsable del incremento de la resistencia de las plantas *csb3-1*. Para estudiar cualquiera de estas dos posibilidades, se estudió el impacto de un inhibidor de la ruta de MEP sobre el incremento de la resistencia a la enfermedad de las plantas *csb3-1* frente a *Pst* DC3000. Para este enfoque, se utilizó fosmidomicina [ácido 3-(N-formil-N-hidroxiamino)-propilfosfónico], un inhibidor competitivo de DXR, la enzima que controla la segunda etapa implicada en la ruta de MEP (figura 6) y que reduce los niveles de los productos finales de esta ruta (es decir, IPP y DMAPP) (Schwender, J., Müller, C., Zeidler, J., and Lichtenthaler, H.K. (1999). Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5 phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 455, 140-144.; Laule, O., Fürholz, A., Chang, H., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Gruissem, W., and Lange, M. (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 6866-6871.). Para desligar esta respuesta de la derivada de una detención del desarrollo del cloroplasto, los tratamientos con fosmidomicina se llevaron a cabo a dosis mucho menores y durante periodos de tiempo más restringidos, que aquellos utilizados experimentalmente por otros (Laule *et al.*, 2003). Los plantones salvajes y *csb3-1* se rociaron una vez con una disolución 25 μM o 50 μM de fosmidomicina a las 48 horas y a las 24 horas antes de su inoculación con *Pst* DC3000, y se registró el crecimiento bacteriano en las plantas inoculadas a 0, 3 y 5 d.p.i. Las plantas tratadas también se sometieron a ensayo para determinar el efecto sobre la expresión normal del gen *P69C-GUS*. Tal como se muestra en la figura 8A, un tratamiento de fosmidomicina 25 μM sobre las plantas *csb3-1* fue suficiente para reducir notablemente el incremento de la resistencia frente a *Pst* DC3000. Esta inhibición fue incluso más evidente tras un tratamiento con fosmidomicina 50 μM que suprimió completamente el incremento de la resistencia atribuida a la mutación *csb3-1* (figura 8A). Con esta última concentración de inhibidor, la respuesta de resistencia observada del mutante era comparable con la alcanzada en las plantas salvajes no tratadas. Los tratamientos de las plantas *csb3-1* con fosmidomicina 5 μM también provocaron una reducción del incremento de la resistencia de las plantas *csb3-1* que sólo se observó a los 5 días después de la inoculación con *Pst* DC3000, por tanto indicativo de un efecto relacionado con la dosis para la acción inhibidora de la fosmidomicina sobre la resistencia observada. La fosmidomicina, a una concentración de 50 μM también mostró un efecto inhibidor sobre la resistencia normal de las plantas salvajes frente a *Pst* DC3000, haciendo que las plantas se volvieran más susceptibles a este patógeno virulento (figura 8A). No se probaron dosis mayores de este inhibidor, ya que pueden tener un efecto colateral de desarrollo / homeostasis del cloroplasto que puede conducir a efectos secundarios no deseados.

Este efecto inhibidor de la fosmidomicina sobre el incremento de la resistencia de las plantas *csb3-1* frente al crecimiento bacteriano también estuvo acompañado de la regulación por disminución de la expresión constitutiva del transgén *P69C-GUS* (figura 8B) y de la de los genes marcadores *PR-1* y GST6 (figura 8C).

Por tanto, puede concluirse que el incremento de la resistencia de las plantas *csb3-1* parece no estar relacionado con una reducción de IPP y su isómero DMAPP, sino más bien con el resultado de una acumulación en exceso del sustrato directo de HDS/CSB3, concretamente MEcPP, o de cualquiera de sus precursores inmediatos. Además, el mismo compuesto parece ejercer un efecto sobre el control de al menos la magnitud de la resistencia de las plantas salvajes frente a la infección por *Pst* DC3000.

Por tanto, en la presente invención se ha identificado un mutante novedoso del gen *CSB3* de *Arabidopsis thaliana*, denominado *csb3-1*, que muestra altos niveles de resistencia frente a los patógenos biotróficos *P. syringae* y *H. parasitica* mientras que conserva la susceptibilidad normal frente a los patógenos necrotróficos *P. cucumerina* y *B. cinerea*, lo cual es útil para la obtención de plantas resistentes a enfermedades producidas por patógenos biotróficos. Los análisis fenotípicos y genéticos indican que *csb3-1* es una mutación recesiva parcial de pérdida de función que da como resultado la activación de las defensas de las plantas. De manera coherente con el incremento observado de la resistencia hacia patógenos biotróficos, las plantas *csb3-1* muestran incremento de la acumulación de SA en condiciones de reposo y una capacidad adicional para aumentar la biosíntesis sobre los niveles salvajes tras la exposición a *Pst* DC3000. Esta observación ofrece una explicación de por qué las plantas *csb3-1* también muestran activación constitutiva de varios genes marcadores relacionados con la defensa (por ejemplo, *PR1*, *PR2* y *GST6*) que finalmente se controlan mediante la ruta de señalización mediada por SA (Durrant y Dong, 2004). Fue particularmente instructivo

en la comprensión del papel de CSB3 en esta ruta de defensa, la observación de que SA se requiere absolutamente para la resistencia conferida por *csb3-1*, tal como se deduce de la supresión de este fenotipo en varios dobles mutantes que se generaron. Los niveles de transcrito génico *PR-1* en estado estacionario, la expresión de *P69C-GUS* y el incremento de la resistencia frente a *Pst* DC3000 se suprimieron de manera llamativa en los dobles mutantes *csb3 pad4*, *csb3 sid2*, *csb3 eds5* y *csb3 NahG* si se compara con los observados en las plantas homocigóticas *csb3-1*. Todas estas observaciones indican que el hecho de mantener intacta la síntesis y acumulación de SA es fundamental para el incremento de la resistencia a la enfermedad en las plantas *csb3-1*. Por tanto, estos estudios indican que el control mediado por *csb3-1* de la respuesta defensiva dependiente de SA parece actuar en alguna fase en los primeros acontecimientos de la interacción planta-patógeno. Además, el incremento de la resistencia de *csb3-1* también requiere componentes que funcionan como transductores de la señal de defensa derivada de SA (tal como NPR1), tal como se demuestra por las plantas dobles mutantes *csb3 nrp1* que se comportan como *npr1* con respecto a la falta de la expresión del gen *PR* y la hipersusceptibilidad a la infección por *Pst* DC3000.

Además, la reversión del fenotipo de resistencia, desde resistente hasta hipersusceptible, sin una supresión del nivel de transcrito génico *PR-1* en estado estacionario en el doble mutante *csb3 dth9*, revela una necesidad también de una ruta intacta dependiente de *DTH9*, después del extremo 3' de acumulación de SA para la resistencia asociada a *csb3-1*. Por tanto, se requiere que ambas rutas NPR1 y DTH9 estén intactas para regular la resistencia a la enfermedad en las plantas *csb3-1*. Curiosamente, el fenotipo de resistencia a la enfermedad de las plantas *csb3-1* está acompañado de la aparición de una tendencia de crecimiento anómala manifestada en forma de enanismo, que está acompañada de la presencia de hojas rizadas en roseta. Esta alteración del desarrollo es también una característica de otros diversos mutantes de Arabidopsis entre los que destacan los mutantes *cpr* (*constitutive expressor of PR genes [que expresa de manera constitutiva los genes PR]*) (Durrant y Dong, 2004). Al igual que *csb3-1*, los mutantes *cpr* son más resistentes al crecimiento de patógenos biotróficos, muestran expresión constitutiva del gen *PR-1* y son completamente dependientes de la acumulación de SA (Bowling *et al.*, 1994). Sin embargo, a diferencia de *csb3-1*, los mutantes *cpr* muestran independencia de NPR1 para el incremento de la resistencia y para expresar las defensas (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.). Además, la generación de plantas dobles mutantes *csb3 cpr1* reveló que ambas mutaciones son aditivas, dando como resultado plantas que muestran un fenotipo extremadamente aberrante que nunca alcanza la fase reproductiva. Por tanto, las mutaciones *csb3-1 y cpr1* pueden contribuir a su característico aumento de la acumulación de SA y sus respectivos fenotipos de incremento de la resistencia a través de rutas independientes.

Utilizando una estrategia de donación posicional, se identificó el gen *CSB3*. *CSB3* complementó la mutación *csb3-1*, tal como se muestra, mediante la reducción de la expresión de los genes *PR*, así como la reversión del incremento de la resistencia en plantas transgénicas *csb3-1* que expresan *CSB3* (figura 7A-C). Por tanto, se volvió a confirmar la epistasis de CSB3 a la acumulación de SA y la expresión de *PR* e incremento de la resistencia frente a *Pst* DC3000. Además, el análisis de la expresión génica en plantas salvajes reveló que *CSB3* se expresa de manera moderada en condiciones de reposo y la expresión está regulada por disminución tras la infección por *Pst* DC3000. Esta regulación por disminución es más pronunciada durante una interacción incompatible, tal como la provocada durante la infección por *Pst* DC3000 (*avrRpm1*). Esta regulación por disminución se correlaciona de manera inversa, tanto en el tiempo como en la intensidad, con la inducción observada de los genes regulados por SA (por ejemplo, *PR-1*) durante la misma interacción planta-patógeno (figura 7D). Estas observaciones sugieren que la regulación por disminución del transcrito CSB3 podría estar implicada funcionalmente en la acumulación de SA y la activación de las defensas de las plantas tras la inducción del patógeno y puede coincidir con CSB3 que actúa como regulador negativo de la ruta dependiente de SA que conduce a la resistencia frente a patógenos biotróficos en plantas salvajes.

En el esfuerzo por identificar supresores del mutante *csb3-1*, en la presente invención denominados mutantes *scs*, se sometieron a mutagénesis semillas *csb3-1* con EMS y se seleccionaron plantas M2 para buscar plantas que habían perdido el característico fenotipo enano y la resistencia de *csb3-1* frente a *Pst* DC3000. Se identificaron cuatro mutantes *scs* en los que el incremento de la resistencia frente a este patógeno estaba revertido hasta un nivel comparable al alcanzado en plantas salvajes (es decir, en plantas *scs2* y *scs11*; figura 4) o incluso inhibido adicionalmente para hacer estas plantas hipersusceptibles al mismo patógeno (es decir, en plantas *scs9* y *scs11*; figura 4). Los mutantes *scs* identificados se corresponden con mutaciones recesivas no alélicas que son extragénicas con respecto al locus *csb3* y conferían el mismo fenotipo incluso en ausencia de la mutación *csb3-1*. Estas observaciones proporcionan pruebas adicionales de que CSB3 es un regulador importante de la respuesta de resistencia a la enfermedad mediada por SA en *Arabidopsis*. Asimismo, estos resultados sugieren que el papel de CSB3 en la respuesta de resistencia a la enfermedad está bajo estricto control, tal como se determina mediante la identificación de los reguladores SCS. La caracterización y donación adicionales del supresor *scs* ayudarán a comprender en detalle cómo funciona esta regulación durante la respuesta de resistencia a la enfermedad.

El gen *CSB3* codifica para la 1-hidroxi-2-metil-2-butenil-4-difosfato [HMBPP] sintasa que cataliza la formación de HMBPP a partir de 2,4-ciclodifosfato de 2-C-metil-D-eritritol [MEcPP] (Kollas *et al.*, 2002). Esta actividad enzimática controla una de las etapas terminales de la biosíntesis de difosfato de isopentenilo [IPP] y su isómero difosfato de dimetilalilo [DMAPP] a través de la ruta del 4-fosfato de 2-C-metil-D-eritritol (MEP) independiente del mevalonato que se produce en el cloroplasto de las plantas superiores (figura 6). La ruta de MEP localizada en el plástido, junto con la ruta dependiente de mevalonato citosólico (MVA), se encargan de la síntesis de precursores de isoprenoides, a partir de los cuales se origina una plétora de diferentes compuestos, metabolitos y hormonas vegetales (Rohmer, 1999). No se pronostica que el mutante *csb3-1* sea un mutante nulo, ya que otros alelos nulos en el gen *CSB3* (es decir,

csb3-2, y *clb4/csb3-3*) son mortales. Por tanto, la pérdida parcial de función atribuida a la sustitución de Gly por Asp identificada en la proteína mutante csb3-1 puede explicarse si se tiene en cuenta que la introducción de un residuo de aminoácidoácido en lugar de uno neutro en el interior o cerca del motivo 4Fe-4S, que está sumamente conservado en este tipo de enzimas, puede alterar una conformación correcta en este dominio que, a su vez, puede desestabilizar en cierto grado el correcto plegamiento de la enzima. Esto coincide con la observación previa de otras mutaciones que tienen lugar en la misma región del homólogo GCPE de *E. coli* (Sauret-Güeto *et al.*, 2003).

Como la pérdida de función asociada con la mutación *csb3-1* da como resultado la activación de la ruta del SA que conduce al incremento de la resistencia observado, se deduce que el desmantelamiento de un compuesto aguas debajo de HDS/CSB3 (debido a la reducción de la actividad enzimática de la enzima csb3-1) o, alternativamente, el exceso de acumulación de un compuesto previo a la acción de la enzima HDS/CSB3 (tal como MEcPP o cualquiera de sus precursores metabólicos antes del extremo 5') debe tener una función en la respuesta defensiva controlada por SA. Se probó esta conjetura examinando el efecto de un inhibidor de la ruta de MEP (es decir, fosmidomicina) sobre el incremento de la resistencia de plantas *csb3-1*, así como sobre la resistencia normal alcanzada en plantas salvajes. La fosmidomicina bloquea la actividad de DXR, la enzima que controla la segunda etapa implicada de la ruta de MEP (figura 6) y por tanto, inhibe la ruta en un paso previo a la acción de HDS/CSB3 (Schwender *et al.*, 1999; Laule *et al.*, 2003). Se observó que el efecto inhibidor de la fosmidomicina puede complementar completamente el fenotipo de incremento de la resistencia asociado a *csb3-1*, así como la expresión de los genes relacionados con la defensa (figura 8). Por tanto, sugiere que la activación de la ruta de SA en el mutante *csb3-1* no se debe a una reducción de un compuesto que surge posterior a la acción de CSB3/HDS que puede comprometer las posteriores etapas enzimáticas que conducen a la biosíntesis de isoprenoides, sino más bien es el resultado de una acumulación en exceso del sustrato directo de HDS/CSB3, concretamente MEcPP, o indirectamente cualquiera de sus precursores inmediatos. Además, la fosmidomicina también afecta a la respuesta de resistencia a la enfermedad de las plantas salvajes frente a *Pst* DC3000, y los tratamientos de plantas con 50 μM de este inhibidor dan como resultado tasas superiores de crecimiento bacteriano (figura 8A). Este hallazgo refuerza adicionalmente la consideración de que el mismo compuesto que se acumula en exceso en las plantas *csb3-1* y regula positivamente el incremento de la resistencia del mutante también es importante para una resistencia normal a la enfermedad en plantas salvajes.

En resumen, estos resultados apuntan en dirección a la participación de una señal / factor cloroplástico, derivado de una de las etapas intermedias iniciales de la ruta de MEP, en el control de la ruta de SA activada por patógenos que conduce a la resistencia a la enfermedad frente a patógenos biotróficos. Esto apoya la importancia del cloroplasto en la mediación de los aspectos críticos de la respuesta defensiva de la planta. Los desafíos para el futuro son determinar qué molécula(s) exacta(s) es (son) responsable(s) del control observado de la ruta de SA y cómo está controlada su acción mediante el producto de los genes *SCS* identificados en la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Caracterización de plantas csb3 y comparación con plantas salvajes

(A) Comparación del aspecto externo de las plantas *csb3* (derecha) y plantas salvajes (wt) (izquierda). Las plantas se fotografiaron cuando tenían 3,5 semanas de edad.

(B) Tinción histoquímica de la actividad GUS dirigida por el promotor de *P69C* en un plantón transgénico salvaje de 14 días de edad (izquierda) y plantones *csb3* (derecha).

(C) Hoja en roseta completamente expandida procedente de una planta transgénica salvaje (izquierda) y plantas *csb3* (derecha) teñidas para determinar la actividad GUS.

(D) Expresión de los genes marcadores *PR-1*, PR-2, *GST6* y *PDF1.2* en plantas salvajes y *csb3*.

(E) Niveles de SA libre y SA total en plantas salvajes y *csb3*. Las plantas salvajes (wt) y *csb3* se inocularon con *Pst* DC3000 o con $MgSO_4$ 10 mM (prueba) y la cantidad de SA libre y glucósido de SA (SAG) determinados 24 horas tras la inoculación. Cada barra representa la media de tres muestras de replicado con la desviación estándar. Se sometieron a ensayo el SA libre y el glucósido de SA (SAG) en las mismas muestras.

Figura 2

Incremento de la resistencia de plantas csb3 frente a patógenos biotróficos pero no necrotróficos

(A) Respuesta de resistencia de plantas mutantes *csb3* y salvajes es de *Arabidopsis* frente a *Hyaloperonospora parasitica* virulenta. Siete días después de la inoculación por rociado de plantas de 2 semanas de edad con 10^5 conidiosporas por mililitro de agua, se tiñeron las hojas con azul de tripano-lactofenol y se observaron con un microscopio para revelar el característico crecimiento extenso de hifas. El crecimiento de este patógeno presentaba una inhibición llamativa en las plantas *csb3*.

(B) Para cuantificar la resistencia frente a *H. parasitica*, se hizo un recuento de la producción de conidios 7 días después de la inoculación con ayuda de un hemocitómetro. Las plantas que llevaban la mutación *csb3* eran sumamente resistentes a este patógeno.

(C) Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plantas salvajes y *csb3*. Se inocularon plantas de dos semanas de edad mediante inmersión en una suspensión bacteriana, y se determinó el título de bacterias, medido como unidades formadoras de colonias (ufc) por peso fresco, a los 0, 3, y 5 días después de la infección para plantas salvajes y *csb3*. Se tomaron ocho muestras para cada genotipo en cada punto de tiempo. Los puntos de datos representan la media ± la desviación estándar de los logaritmos. El experimento se repitió tres veces con resultados similares. Las plantas que llevaban la mutación *csb3* eran sumamente resistentes a este patógeno.

(D) Respuesta de resistencia de plantas salvajes y *csb3* frente a *Plectosphaerella cucumerina*. Se inocularon las plantas aplicando gotas de 6 μl de suspensión de esporas (5 x 10^6 esporas/ml) de *P. cucumerina* a hojas completamente expandidas. Se evaluaron los síntomas de enfermedad 4 días después de la inoculación determinando los diámetros medios de lesión en 3 hojas de 8 plantas cada vez. Los puntos de datos representan el tamaño medio de lesión ± DE de las medidas. Las plantas que llevaban la mutación *csb3* eran tan resistentes a este patógeno como las plantas salvajes.

(E) Hojas de plantas salvajes y *csb3* a los 4 días después de la inoculación con una gota de 6 μl de esporas de *Botrytis cinerea* (2,5 x 10^4 conidias/ml).

(F) Se midió el tamaño de lesión generado por *Botrytis cinerea* a los 4 días después de la inoculación. Los puntos de datos representan el tamaño medio de lesión ± DE de las medidas procedentes de un mínimo de 30 lesiones. Este experimento se repitió tres veces con resultados similares. wt, salvaje. Las plantas que llevaban la mutación *csb3* eran tan resistentes a este patógeno como las plantas salvajes.

Figura 3

Efecto de mutaciones relacionadas con SA sobre la respuesta de resistencia a la enfermedad de plantas csb3

(A) Crecimiento de *Pst DC3000* en los dobles mutantes *csb3 pad4*, *csb3 sid2*, *csb3 eds5*, *csb3 nahG*, *csb3 dth9*, *csb3 npr1* comparado con el crecimiento en mutantes sencillos y plantas salvajes. Se registró el crecimiento bacteriano en muestras de hojas que se recogieron inmediatamente después de la infección, a los 3 días después de la inoculación (d.p.i) y a los 5 d.p.i. Se tomaron ocho muestras para cada genotipo en cada punto de tiempo. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

(B) Análisis de RT-PCR de la expresión génica de *PR-1* y *GST6* en mutantes relacionados con SA, así como en dobles mutantes *csb3* y plantas salvajes. El gel inferior muestra una RT-PCR para el gen de mantenimiento ("house-keeping") eIF4α utilizado en la presente invención como un control de carga.

(C) Hoja en roseta completamente expandida procedente de una planta original salvaje (centro), plantas *csb3* (izquierda) y plantas *csb3 nahG* (derecha) teñidas para determinar la actividad GUS dirigida por el promotor del gen *P69C*.

Figura 4

Caracterización de supresores de csb3

(A) Cuadro superior: fenotipos morfológicos de los mutantes *scs* que actúan como supresores del fenotipo *csb3*. Se hicieron crecer todas las plantas en paralelo en el suelo y se fotografiaron cuando tenían 4 semanas de edad. Cuadro inferior: supresión de la expresión del gen indicador *P69C-GUS* inducida por *csb3* en hojas procedentes de mutantes supresores *scs*.

(B-C) Incremento de la susceptibilidad a la enfermedad frente a *Pst* DC3000 de los diferentes mutantes *scs*. Se registró el crecimiento bacteriano a los 0, 3 y 5 días después de la inoculación (d.p.i). El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Figura 5

Clonación posicional y estructura de CSB3

(A) Región de 0,8 Mb en el cromosoma 5 con BAC superpuestos, flanqueados por los marcadores de SSLP, Nga129 y MBK-5, utilizados para la detección de recombinaciones en 1496 cromosomas.

(B) Localización de *CSB3* en la región secuenciada correspondiente al clon de BAC, MUF9. *CSB3* estaba situado entre dos marcadores de SSLP que comprenden una región de 66 kb.

(C) Estructura de exón/intrón de *CSB3*. Las regiones codificantes están indicadas con líneas gruesas. Las posiciones de las mutaciones *csb3-1*, *csb3-2* y *clb4/csb3-3* se muestran en la parte superior de cada uno de los exones respectivos.

El inserto presenta el intercambio de nucleótidos encontrado en el mutante *csb3-1* y su influencia sobre la secuencia proteica. El alelo mutante está indicado debajo de la secuencia salvaje. Las letras mayúsculas marcan las secuencias nucleotídicas en la mitad del exón 19. La transición de "G" a "A" debida al mutágeno está indicada en negrita. Las secuencias de aminoácidos deducidas están indicadas como un código de letras individuales debajo de cada triplete de nucleótidos y las letras en negrita marcan los cambios de aminoácidos (G a D) en las secuencias proteicas.

(D) Secuencia de aminoácidos deducida de la enzima hidroximetilbutenil-4-difosfato sintasa (HDS, también denominada GcpE en los microorganismos) asociada a plástido codificada por *CSB3*. La secuencia señal pronosticada para el transporte de plástido (programa ChloroP) se muestra subrayada en el extremo N-terminal. En cursiva, se muestran las regiones homólogas entre homólogos HDS de planta y el homólogo GcpE procedente de microorganismos. El dominio proteico comprendido entre estos dos dominios conservados es específico de la planta, ya que no está presente en la enzima GcpE procedente de microorganismos. En el extremo C- terminal, se muestran con un asterisco los residuos de cisteína conservados que están sumamente conservados en todas las enzimas HDS y GcpE. Subrayados están los residuos conservados que comprenden el distintivo ("signature") donde se halla el cluster [4Fe-4S] (Sauret-Güeto *et al.*, 2003). El residuo de glicina convertido en residuo aspártico en el mutante *csb3-1* se muestra en negrita en la posición 695 y está cerca de la secuencia conservada que participa en la coordinación de [4Fe-4S].

Figura 6

Diagrama de la ruta metabólica de 4-fosfato de metil-D-eritritol (MEP)

Las abreviaturas de las enzimas que catalizan cada etapa de la ruta se muestran en el lado izquierdo de la figura en negrita tal como sigue: 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS); 2*C*-metil-D-eritritol-4-fosfato sintasa (DXR); 4-difosfocitidil-2*C*-metil-D-eritritol-4-fosfato sintasa (CMS); 4-difosfocitidil-2*C*-metil-D-eritritol cinasa (CMK); 2*C*-metil-D-eritritol-2,4-difosfato sintasa (MCS); 2*C*-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato reductasa (HDS); 1-hidroxi-2-metil-butenilo reductasa-4-difosfato (HDR); isopentenil-difosfato isomerasa (IDI). Los nombres de algunos de los mutantes encontrados están indicados en el lado derecho del diagrama. La posición de la mutación *csb3* se muestra. También se indica la posición en la que se sabe que la fosmidomicina inhibe la ruta.

Figura 7

Complementación de plantas csb3-1 y regulación por disminución de la expresión génica de CSB3 tras la infección por Pst DC3000

(A-C) Caracterización fenotípica y molecular de plantas *csb3-1* transformadas de manera estable con un constructo génico *35S-CSB3*. (A) Aspecto morfológico de plantas *csb3-1* no transformadas comparado con dos líneas transgénicas. Obsérvese la reversión hacia un fenotipo salvaje en las líneas transgénicas. La tinción histoquímica de la actividad GUS dirigida por el promotor de *P69C* en hojas en roseta completamente expandidas obtenidas de plantas *csb3-1* no transformadas y de las dos líneas transgénicas se muestra en el mismo cuadro.

(B) Respuesta de resistencia frente a *Pst* DC3000 de dos líneas transgénicas *csb3* independientes (línea 1.1 y línea 5.6) transformadas de manera estable con un constructo génico *35S-CSB3* y comparación de la respuesta de resistencia observada en el tipo salvaje (wt) y el mutante *csb3-1*. Obsérvese que las líneas transgénicas han perdido el incremento de la resistencia asociada con la mutación *csb3-1*. Se registró el crecimiento bacteriano a los 0, 3 y 5 días después de la inoculación (d.p.i). El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

(C) Análisis de RT-PCR de la expresión génica de *PR-1* y *GST6* en plantas *csb3-1* así como en plantas salvajes y en las líneas transgénicas (líneas 1.1 y 5.6) que expresan el constructo génico *35S-CSB3*. Obsérvese que las plantas transgénicas ya no expresan de manera constitutiva los genes marcadores relacionados con SA. El gel inferior muestra una RT-PCR para el gen de mantenimiento eIF4α utilizado en la presente invención como control de carga.

(D) Análisis de RT-PCR de la expresión génica de *CSB3* y *PR-1* en plantas salvajes tras la infección por *Pst* DC3000 que llevan o no el gen de avirulencia *avrRpm1*. Los números indican las horas tras la inoculación. El nivel de expresión de estos dos genes también se analizó en plantas *csb3-1* sanas y se muestra a la izquierda para comparar. El gel inferior muestra una RT-PCR para el gen de mantenimiento eIF4α, utilizado en la presente invención como control de carga. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Figura 8

Complementación farmacológica del incremento de la resistencia de csb3-1 con fosmidomicina

(A) Se rociaron plantones salvajes (wt) y *csb3-1* de *Arabidopsis* una vez a las 48 horas y a las 24 horas antes de su exposición a Pst DC3000 con una solución tampón complementada con fosmidomicina 25 μM o 50 μM (+ fosm). Los controles se trataron de manera similar con solución tampón sola. Las plantas se expusieron a *Pst* DC3000 y se registró el crecimiento del patógeno a los 0, 3 y 5 días después de la inoculación (d.p.i).

(B) Efecto del tratamiento con fosmidomicina (25 μM, tratados tal como se indica en (A) sobre la expresión constitutiva de *P69C-GUS* en plantones *csb3-1* (derecha) comparado con plantones *csb3-1* tratados con tampón (izquierda).

(C) Efecto del tratamiento con fosmidomicina (25 μM, tratados tal como se indica en (A) sobre la expresión constitutiva de genes marcadores regulados por SA en plantones *csb3-1* de *Arabidopsis* comparado con plantones *csb3-1* tratados con tampón.

Exposición detallada de un modo de realización

Plantas, condiciones de crecimiento y tratamientos

Se hicieron crecer plantas de *Arabidopsis thaliana* en el suelo o en placas que contienen medio de Murashige y Skoog (MS) tal como se describió anteriormente (Mayda *et al.*, 2000). El mutante *csb3-1* se aisló en una selección para determinar los que expresan de manera constitutiva el gen indicador *P69C-GUS* en plantas transgénicas Columbia (Col-0) sometidas a mutagénesis con metanosulfonato de etilo (EMS), tal como se describió anteriormente para otros mutantes (Mayda *et al.*, 2000). La línea mutante *csb3-1* utilizada en estos experimentos se había sometido a retrocruzamiento al menos cuatro veces con la linea original salvaje. Se hicieron crecer las plantas en una cámara de crecimiento (19-23°C, iluminación fluorescente de 100 μEm^{-2} seg^{-1}) en un ciclo de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad. A menos que se indique lo contrario, se utilizaron hojas expandidas completamente de plantas de 4 semanas de edad para todos los experimentos. La tinción para determinar la presencia de actividad GUS se llevó a cabo tal como se describió anteriormente (Mayda *et al.*, 2000).

Infección patogénica

Se hizo crecer *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 y se preparó para su inoculación tal como se describió anteriormente (Mayda *et al.*, 2000). Las plantas se inocularon mediante el método de inmersión según Tornero, P. and Dangl, J. L. (2001). A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 28: (4): 475-481. La densidad de las poblaciones bacterianas se determinó mediante cultivo en placa de diluciones en serie sobre medio B de King complementado con rifampicina (50 μg/ml) a 28°C y haciendo un recuento de las unidades formadoras de colonias en diferentes tiempos, tal como se describió anteriormente (Mayda *et al.*, 2000). Los datos se notifican como medias y desviaciones estándar del logaritmo (ufc/g de peso fresco) de seis a ocho replicados. Se realizaron ensayos de resistencia frente a *Hyaloperonospora parasitica* en plantas de tres semanas de edad rociadas con una suspensión de 10^5 conidiosporas ml-1 de agua del grifo, tal como se describió anteriormente (Mayda *et al.*, 2000). Al séptimo día, se valoró la densidad de las esporas en las plántulas (siete macetas por tratamiento, cada maceta tratada por separado) utilizando un hemocitómetro. Alternativamente, se tiñeron muestras de hojas con azul de tripano-lactofenol en días diferentes después de la inoculación y se examinaron bajo el microscopio, tal como se describió anteriormente (Mayda *et al.*, 2000).

Para la resistencia frente a *Plectosphaerella* y *Botrytis*, se trasplantaron plantones de tres semanas de edad a macetas individuales y se cultivaron a temperaturas de 22°C de día / 18°C de noche con 12 h de luz cada 24 h. Cuando las plantas tenían una edad de 6 semanas, se inocularon aplicando gotas de 6 μl de suspensión de esporas de *Plectosphaerella cucumerina* (5 x 10^6 esporas ml^{-1}) o de *Botrytis cinerea* (2,5 x 10^4 conidias ml^{-1}) a 3 hojas completamente expandidas por planta. Se aisló *P. cucumerina* de *Arabidopsis* con infección salvaje (registro Landsberg *erecta*), y se hizo crecer sobre 19,5 g/L de agar dextrosa de patata (Difco, Detroit, MI) a temperatura ambiente durante 2 semanas antes de recoger las esporas y suspenderlas en $MgSO_4$ 10 mM. *B. cinerea* (cepa BMM1, aislada de *Pelargonium zonale*) se hizo crecer sobre 19,5 g/1 de agar dextrosa de patata (Difco) a 20°C durante 10 días. Las conidias se recogieron y se suspendieron en PDS estéril (12 g 1^{-1}; Difco). Las plantas se mantuvieron al 100% de HR y se evaluaron los síntomas de enfermedad de 4 a 10 días después de la inoculación determinando el diámetro medio de lesión en 3 hojas de 5 plantas cada vez.

Análisis genético

Se realizaron cruces cortando brotes no abiertos y utilizando los pistilos como recipientes para polen. Se realizaron retrocruzamientos con la línea transgénica original utilizando plantas *P69C-GUS* como el donante de polen. También se realizaron cruces recíprocos. Las plantas F1 y F2 se hicieron crecer en placas MS y se analizaron para determinar la actividad GUS. Se analizó la segregación del fenotipo en la generación F2 para determinar la adecuación del ajuste con la prueba de chi-cuadrado.

Clonación basada en el mapeo

Se cruzó una planta *csb3* (en el resto de Columbia) con Landsberg *erecta*, y se seleccionaron para el mapeo mutantes homocigóticos *csb3* entre la progenie F2 segregante. Se identificaron plantones recombinantes utilizando los marcadores de polimorfismo de longitud de secuencia única (SSLP) según el protocolo descrito por Bell y Ecker (1994) y con nuevos marcadores tal como se informó en el sitio web de la base de datos de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org).

Generación de dobles mutantes

Los alelos de mutantes utilizados en todo este estudio fueron *npr1-1* (Cao *et al.* 1997), *pad4-1*, *sid2-1* (Wildermuth *et al.*, 2001), *eds5* (Nawrath *et al.*, 2002) y *dth9* (Mayda *et al.*, 2000). Se ha descrito la planta transgénica (en el ecotipo Columbia) que expresa el gen bacteriano *NahG*. Los dobles mutantes *csb3 npr1*, *csb3 pad4*, *csb3 sid2*, *csb3 eds5*, *csb3 dth9* y *csb3 NahG* se generaron utilizando *csb3* como receptor del polen. La característica homocigótica de los loci se

confirmó utilizando un marcador molecular para cada uno de los alelos en las poblaciones segregantes. Para el mutante doble que contiene *dth9*, la hipersusceptibilidad a *Pst* DC3000 fue el criterio utilizado para valorar la característica homocigótica. Todos los dobles mutantes se confirmaron en la generación F3.

Clonación de ADNc y complementación inversa

Se utilizó la secuencia genómica como la base para la Clonación del ADNc de CSB3. Se aisló el ARN poli(A+) de plantas salvajes y se transcribió de manera inversa utilizando cebadores oligo(dT), tal como se ha descrito (Mayda, 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.). Este ADNc se amplificó mediante PCR utilizando cebadores específicos de genes diseñados para incluir la región antes del extremo 5' del codón de iniciación y parte de la región 3' que sigue al codón de terminación del gen *CSB3*. Las secuencias de los cebadores directos e inversos de *CSB3* utilizados fueron: (5'-CTTCCTCTGGATCCTTCTCTTCTC-3') y (5'-GGACACTAGTTCAAAATGATGATG-3'), respectivamente. El ADNc se clonó en el vector binario pBI121 (Clontech) bajo el control del promotor constitutivo 35S de CaMV. Desde allí se transfirió el constructo a pCAMBIA1300 dando como resultado pCAMBIA35SCSB3 que, a su vez, se transfirió a *Agrobacterium* y se utilizó para transformar las plantas *csb3-1* mediante 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.).

Determinación de SA

Se determinó el contenido libre y conjugado de SA en las hojas, en extractos metanólicos mediante análisis con HPLC tal como se describió anteriormente (Mayda *et al.*, 1999).

Análisis de la expresión

Para analizar el nivel de expresión génica mediante PCR mediada por transcriptasa inversa, se prepararon muestras de ARN total procedente de tejidos de hoja utilizando el kit Totally RNA de Ambion (Austin, TX). La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando el kit de RT para PCR de Clontech (Palo Alto, CA). Los conjuntos de cebadores oligonucleotídicos (50 pmol cada uno) utilizados para amplificar CSB3 fueron: CSB3PCR1 (5'GGAGGCCTTCTTGTGGATGG-3') / CSB3PCR2 (5'GCTGACCCAACGACCATGTTC-3'). Los cebadores utilizados para amplificar GST6 fueron GST6PCR1 (5'-ATGGCAGGAATCAAAGTTTCGGTC-3') / GST6PCR2 (5'-GAGATTCACTTAAAGAACCTTCTG-3'). Los cebadores utilizados para amplificar PRI fueron PR1PCR1 (5'-ATGAATTTTACTGGCTATTC-3') / PR1PCR2 (5'-AACCCACATGTTCACGGCGGA-3').

REIVINDICACIONES

1. Un alelo mutante del gen *CSB3* de *Arabidopsis thaliana*, denominado *csb3-1*, **caracterizado** por conferir a las plantas resistencia frente a enfermedades producidas por patógenos biotróficos.

2. Mutante *csb3-1* según la reivindicación 1, **caracterizado** por su secuencia SEC. ID. NO. 1, en la que presenta una sustitución de un residuo de Glicina por uno de Ácido Aspártico en la posición 695.

3. Mutante *csb3-1* según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por conferir expresión constitutiva de los genes *PR-1*, *PR-2* y *GST6*, completamente dependiente de la acumulación de ácido salicílico.

4. Utilización del alelo mutante *csb3-1* en especies vegetales de interés agronómico, para la obtención de plantas resistentes a enfermedades producidas por patógenos biotróficos.

5. Plantas mutantes *csb3-1* **caracterizadas** porque el aumento de resistencia que presentan frente a patógenos biotróficos, viene determinado por la perdida de función del gen CSB3 y por tanto de la enzima 1-hidroxi-2-metil-2-butenil-4-difosfato sintasa por él codificada y que debe resultar en una sobre-acumulación de su sustrato inmediato, es decir el 2,4-ciclodifosfato de 2-C-metil-D-eritritol o de alguno de los intermediarios metabólicos que le preceden según la ruta MEP.

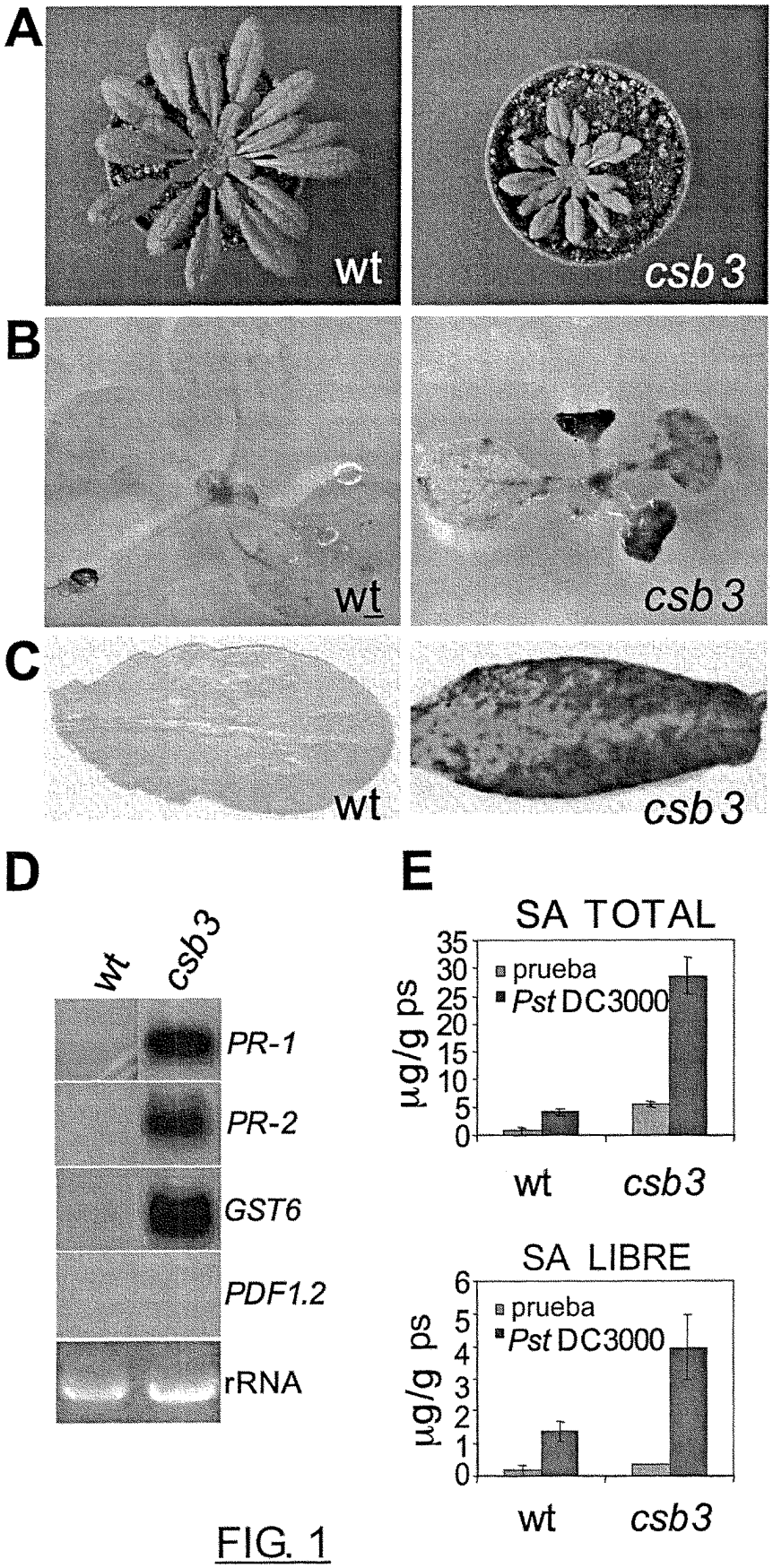
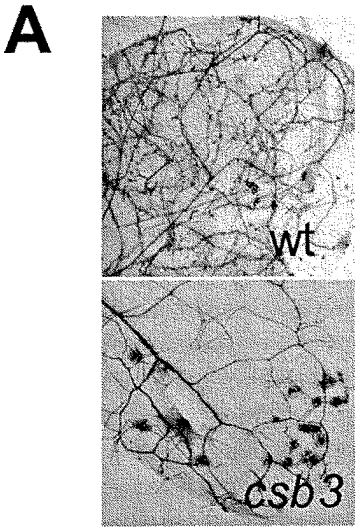
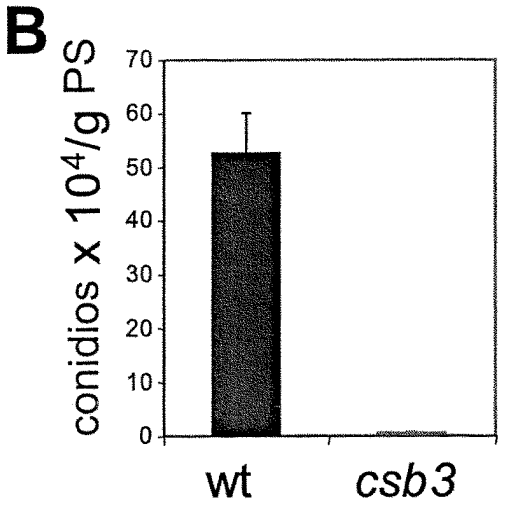
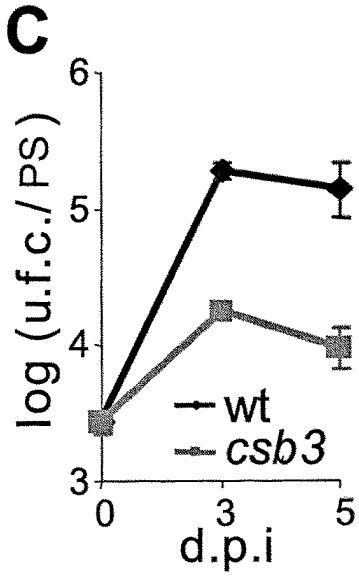
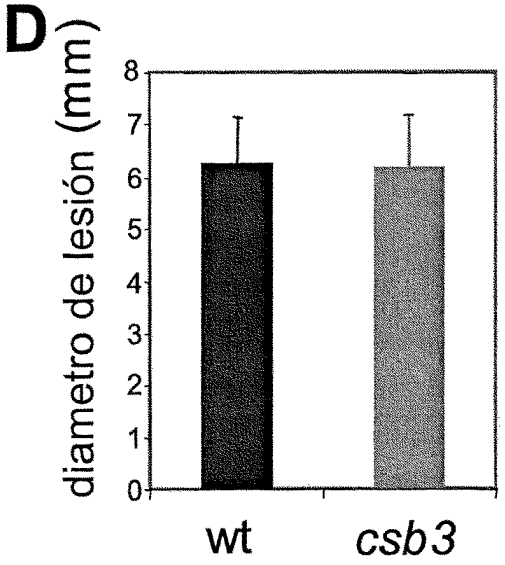

A
wt
csb 3
B
wt
csb 3
C
wt
csb 3
D
wt
csb3
PR-1
PR-2
GST6
PDF1.2
rRNA
E
SA TOTAL
µg/g ps
35
30
25
20
15
10
5
0
prueba
Pst DC3000
wt
csb3
SA LIBRE
µg/g ps
6
5
4
3
2
1
0
prueba
Pst DC3000
wt
csb3

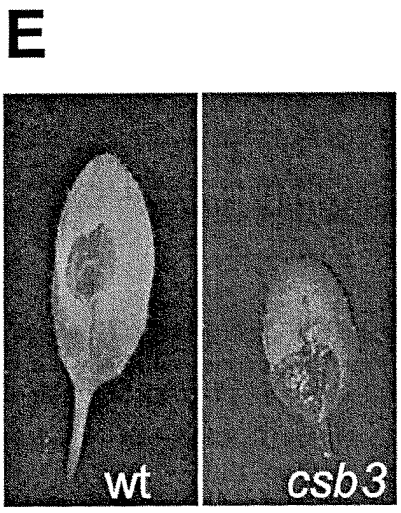
FIG. 1


A
wt
csb3


B
conidios x 10⁴/g PS
70
60
50
40
30
20
10
0
wt
csb3


C
log (u.f.c./ PS)
6
5
4
3
wt
csb3
0
3
5
d.p.i


D
diametro de lesión (mm)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
wt
csb3


E
wt
csb3

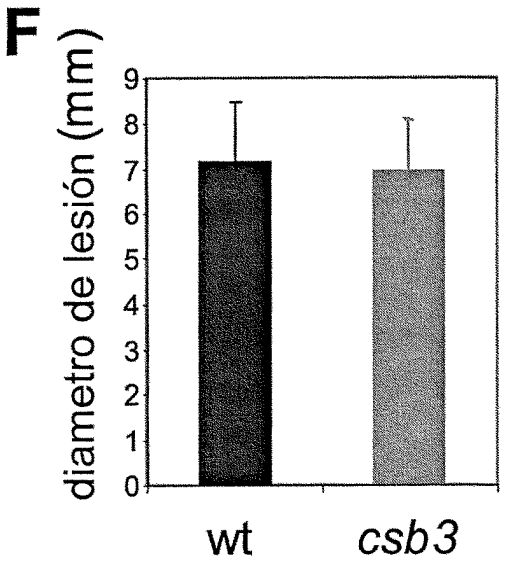

F
diametro de lesión (mm)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
wt
csb3

FIG. 2

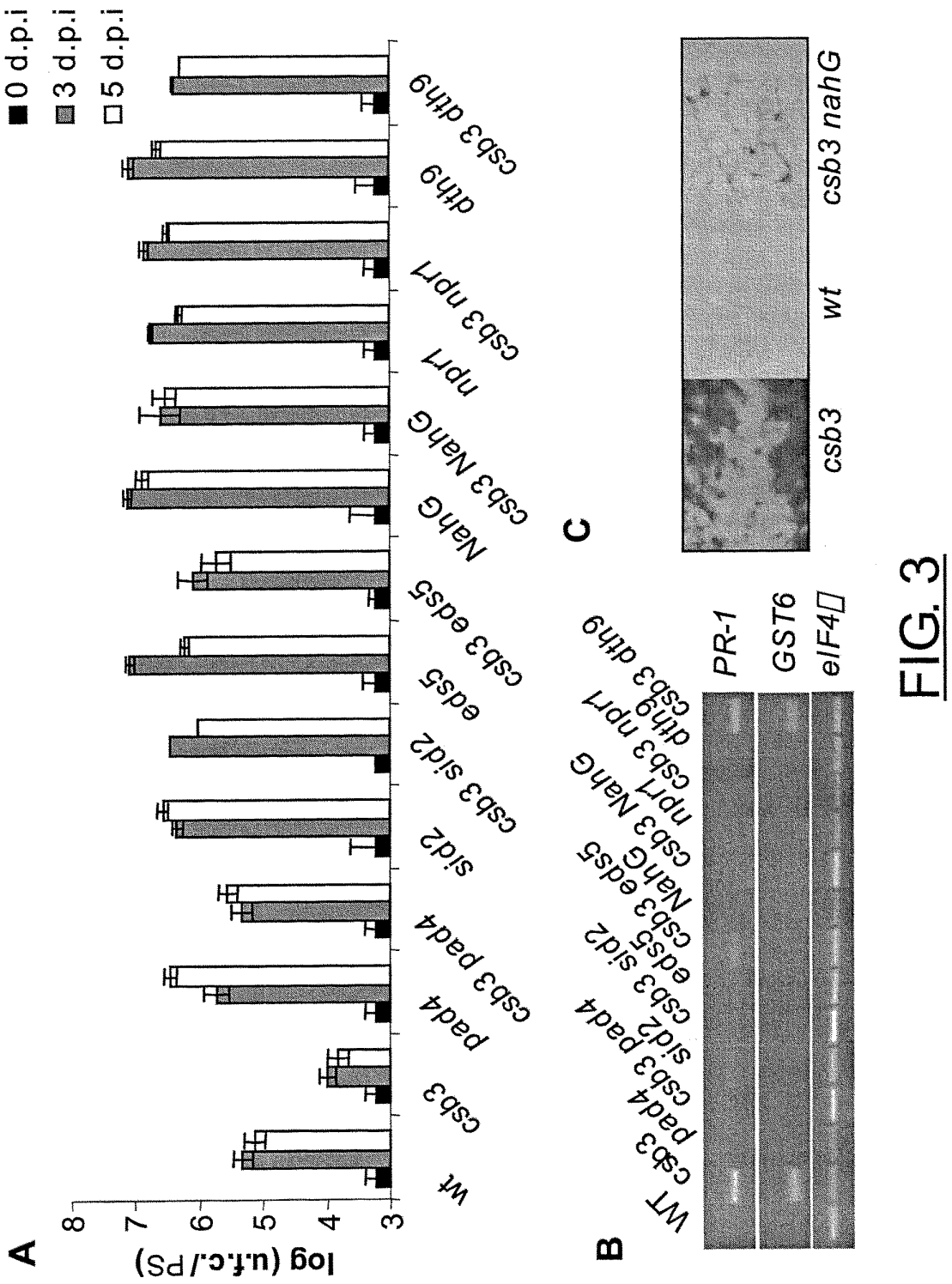

A
log (u.f.c./PS)
8
7
6
5
4
3
0 d.p.i
3 d.p.i
5 d.p.i
wt
csb3
pad4
csb3 pad4
sid2
csb3 sid2
eds5
csb3 eds5
NahG
csb3 NahG
npr1
csb3 npr1
dth9
csb3 dth9
B
WT
csb3
pad4
csb3 pad4
sid2
csb3 sid2
eds5
csb3 eds5
NahG
csb3 NahG
npr1
csb3 npr1
dth9
csb3 dth9
PR-1
GST6
eIF4
C
csb3
wt
csb3 nahG

FIG. 3

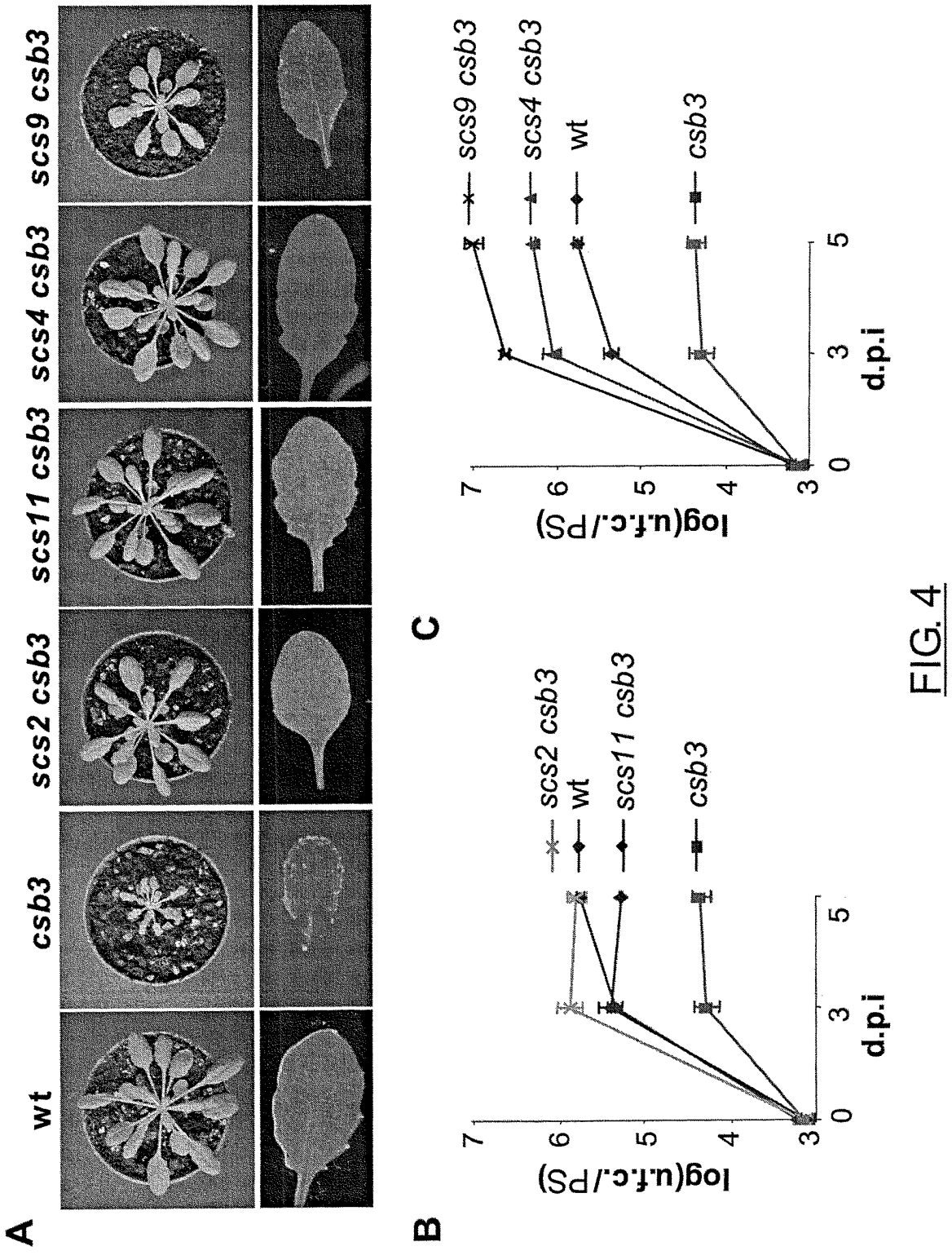
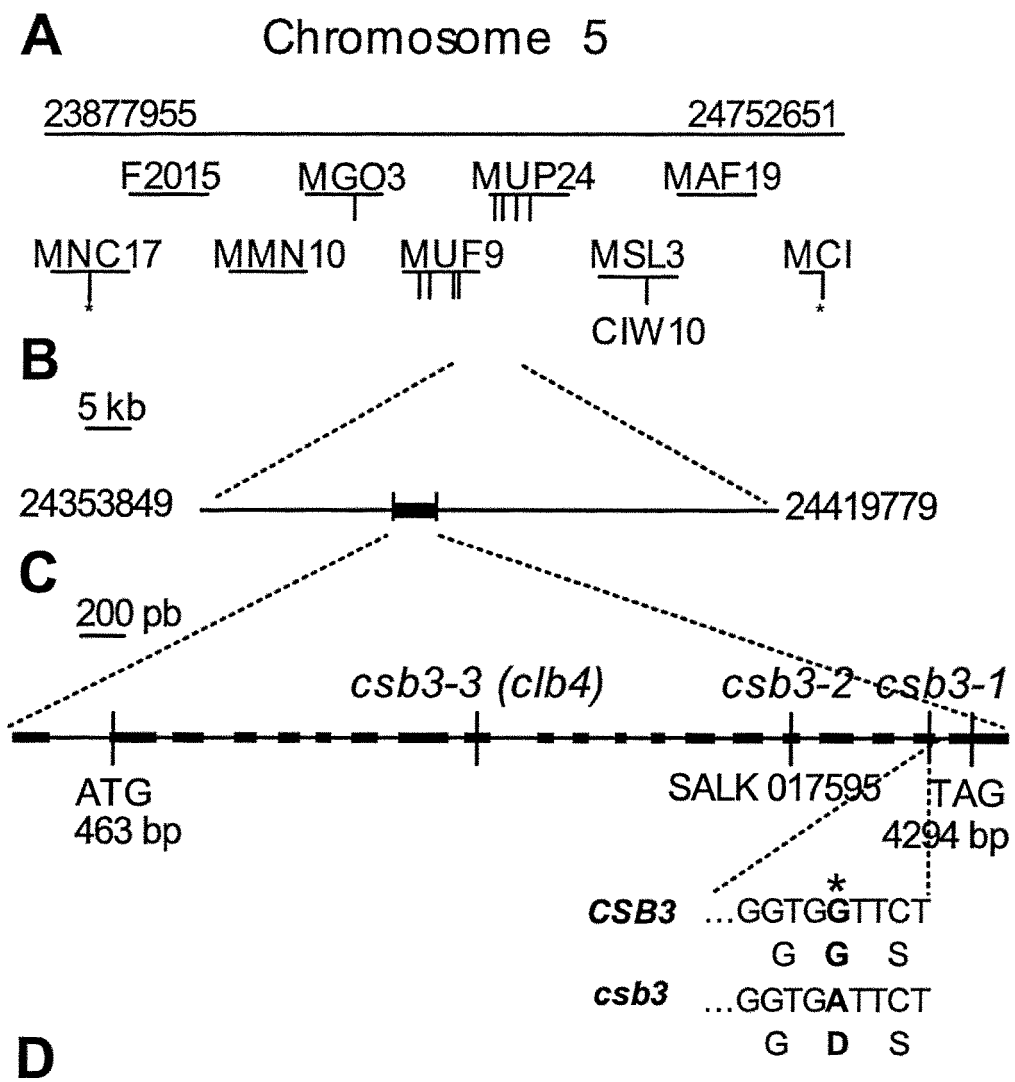

A
wt
csb3
scs2 csb3
scs11 csb3
scs4 csb3
scs9 csb3
B
log(u.f.c./PS)
d.p.i
scs2 csb3
wt
scs11 csb3
csb3
C
log(u.f.c./PS)
d.p.i
scs9 csb3
scs4 csb3
wt
csb3

FIG. 4



D

```
1   MATGVLPAPVSGIKIPDSKVGFGKSMNLVRICDVRSLRSARRRVSVIRNSNQGSDLAELQ
61  PASEGSPLLVPRQKYCESLHKTVRRKTRTVMVGNVALGSEHPIRIQTMTTSDTKDITGTV
121 DEVMRIADKGADIVRITVQGKKEADACFEIKDKLVQLNYNIPLVADIHFAPTVALRVAEC
181 FDKIRVNPGNFADRRAQFETIDYTEDEYQKELQHIEQVFTPLVEKCKKYGRAMRIGTNHG
241 SLSDRIMSYYGDSPRGMVESAFEFARICRKLDYHNFVFSMKASNPVIMVQAYRLLVAEMY
301 VHGWDYPLHLGVTEAGEGEDGRMKSAIGIGTLLQDGLGDTIRVSLTEPPEEEIDPCRRLA
361 NLGTKAAKLQQGAPFEEKHRHYFDFQRRTGDLPVQKEGEEVDYRNVLHRDGSVLMSISLD
421 QLKAPELLYRSLATKLVVGMPFKDLATVDSILLRELPPVDDQVARLALKRLIDVSMGVIA
481 PLSEQLTKPLPNAMVLVNLKELSGGAYKLLPEGTRLVVSLRGDEPYEELEILKNIDATMI
541 LHDVPFTEDKVSRVHAARRLFEFLSENSVNFPVIHHINFPTGIHRDELVIHAGTYAGGLL
601 VDGLGDGVMLEAPDQDFDFLRNTSFNLLQGCRMRNTKTEYVSCPSCGRTLFDLQEISAEI
661 REKTSHLPGVSIAIMGCIVNGPGEMADADFGYVGGSPGKIDLYVGKTVVKRGIAMTEATD
721 ALIGLIKEHGRWVDPPVADE
```

FIG. 5

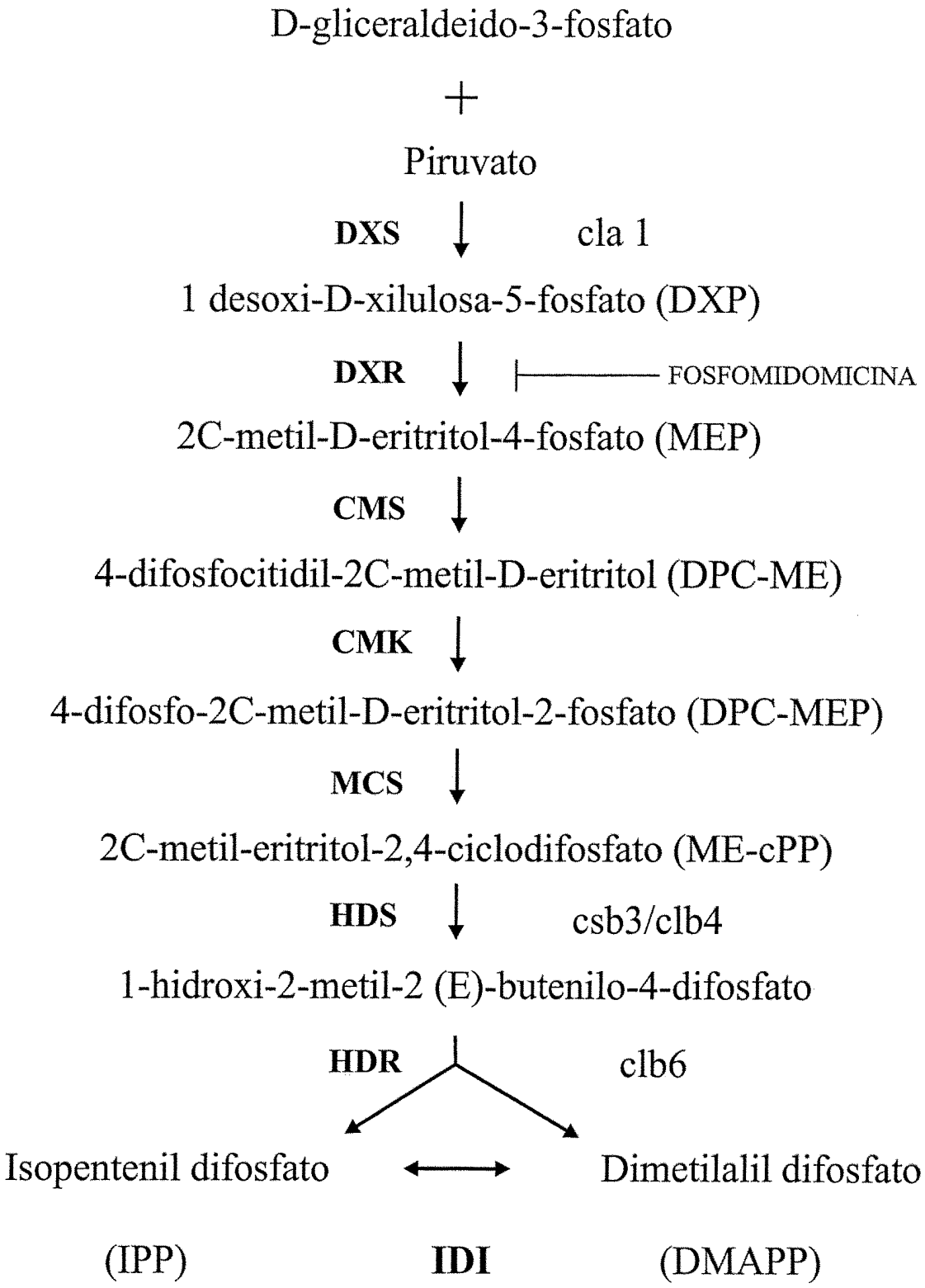

D-gliceraldeido-3-fosfato
+
Piruvato
DXS
cla 1
1 desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP)
DXR
FOSFOMIDOMICINA
2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP)
CMS
4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol (DPC-ME)
CMK
4-difosfo-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato (DPC-MEP)
MCS
2C-metil-eritritol-2,4-ciclodifosfato (ME-cPP)
HDS
csb3/clb4
1-hidroxi-2-metil-2 (E)-butenilo-4-difosfato
HDR
clb6
Isopentenil difosfato
Dimetilalil difosfato
(IPP)
IDI
(DMAPP)

FIG. 6

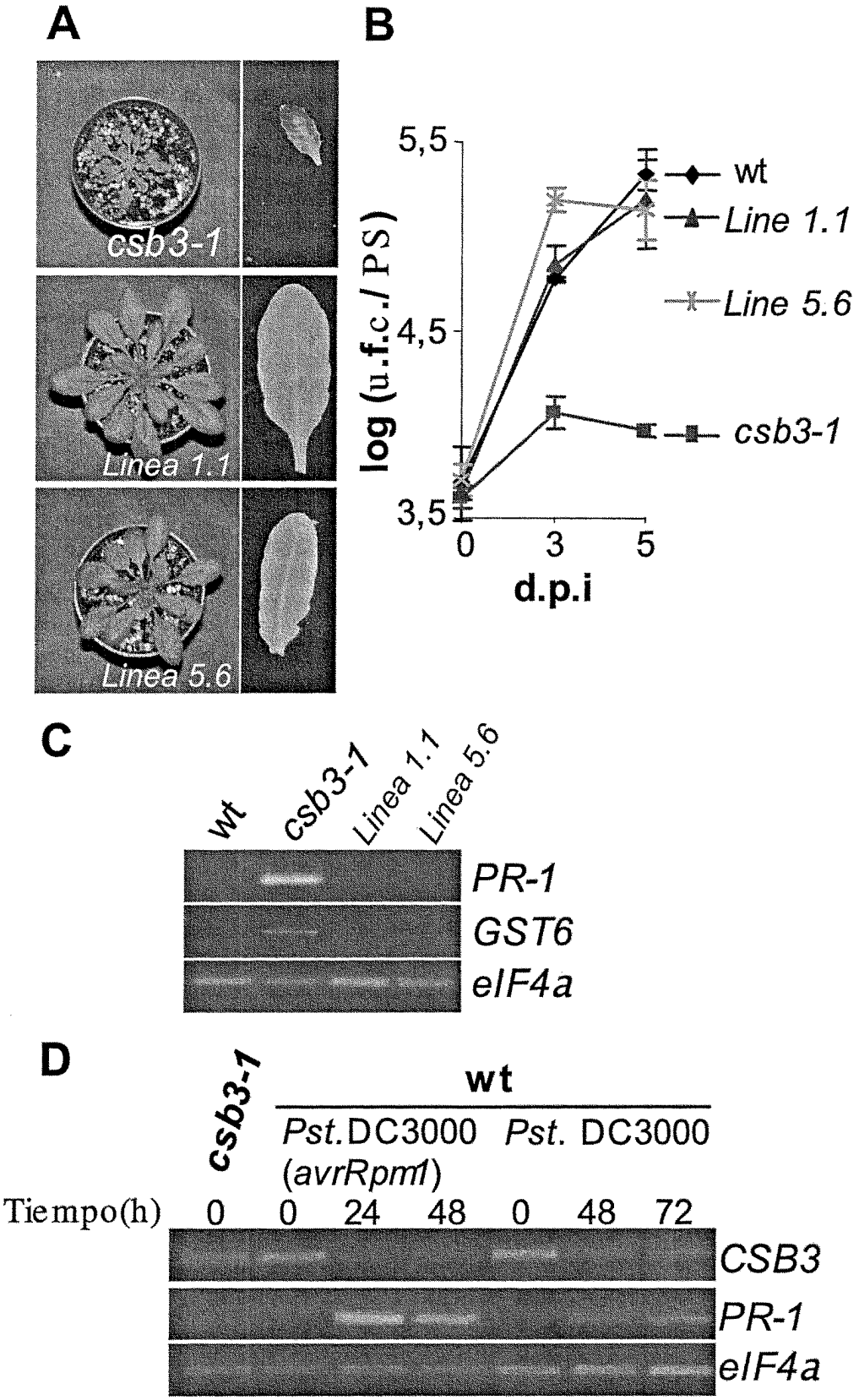

A
csb3-1
Linea 1.1
Linea 5.6
B
5,5
4,5
3,5
log (u.f.c./ PS)
0
3
5
d.p.i
wt
Line 1.1
Line 5.6
csb3-1
C
wt
csb3-1
Linea 1.1
Linea 5.6
PR-1
GST6
eIF4a
D
csb3-1
wt
Pst.DC3000 (avrRpm1)
Pst. DC3000
Tiempo(h)
0 0 24 48 0 48 72
CSB3
PR-1
eIF4a

FIG. 7

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Politécnica de valencia

<120> Aislamiento y caracterización del mutante csb3 de *A. thaliana* y su uso como regulador de la resistencia en plantas a enfermedades producidas por patógenos biotróficos

<130> P-INCI-N-05-0089

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 740

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

```
Met Ala Thr Gly Val Leu Pro Ala Pro Val Ser Gly Ile Lys Ile Pro
1               5                  10                  15

Asp Ser Lys Val Gly Phe Gly Lys Ser Met Asn Leu Val Arg Ile Cys
            20                  25                  30

Asp Val Arg Ser Leu Arg Ser Ala Arg Arg Arg Val Ser Val Ile Arg
        35                  40                  45

Asn Ser Asn Gln Gly Ser Asp Leu Ala Glu Leu Gln Pro Ala Ser Glu
    50                  55                  60

Gly Ser Pro Leu Leu Val Pro Arg Gln Lys Tyr Cys Glu Ser Leu His
65                  70                  75                  80

Lys Thr Val Arg Arg Lys Thr Arg Thr Val Met Val Gly Asn Val Ala
                85                  90                  95

Leu Gly Ser Glu His Pro Ile Arg Ile Gln Thr Met Thr Thr Ser Asp
            100                 105                 110

Thr Lys Asp Ile Thr Gly Thr Val Asp Glu Val Met Arg Ile Ala Asp
        115                 120                 125

Lys Gly Ala Asp Ile Val Arg Ile Thr Val Gln Gly Lys Lys Glu Ala
    130                 135                 140

Asp Ala Cys Phe Glu Ile Lys Asp Lys Leu Val Gln Leu Asn Tyr Asn
145                 150                 155                 160

Ile Pro Leu Val Ala Asp Ile His Phe Ala Pro Thr Val Ala Leu Arg
                165                 170                 175

Val Ala Glu Cys Phe Asp Lys Ile Arg Val Asn Pro Gly Asn Phe Ala
            180                 185                 190
```

Asp Arg Arg Ala Gln Phe Glu Thr Ile Asp Tyr Thr Glu Asp Glu Tyr
195 200 205

Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Glu Gln Val Phe Thr Pro Leu Val Glu
210 215 220

Lys Cys Lys Lys Tyr Gly Arg Ala Met Arg Ile Gly Thr Asn His Gly
225 230 235 240

Ser Leu Ser Asp Arg Ile Met Ser Tyr Tyr Gly Asp Ser Pro Arg Gly
245 250 255

Met Val Glu Ser Ala Phe Glu Phe Ala Arg Ile Cys Arg Lys Leu Asp
260 265 270

Tyr His Asn Phe Val Phe Ser Met Lys Ala Ser Asn Pro Val Ile Met
275 280 285

Val Gln Ala Tyr Arg Leu Leu Val Ala Glu Met Tyr Val His Gly Trp
290 295 300

Asp Tyr Pro Leu His Leu Gly Val Thr Glu Ala Gly Glu Gly Glu Asp
305 310 315 320

Gly Arg Met Lys Ser Ala Ile Gly Ile Gly Thr Leu Leu Gln Asp Gly
325 330 335

Leu Gly Asp Thr Ile Arg Val Ser Leu Thr Glu Pro Pro Glu Glu Glu
340 345 350

Ile Asp Pro Cys Arg Arg Leu Ala Asn Leu Gly Thr Lys Ala Ala Lys
355 360 365

Leu Gln Gln Gly Ala Pro Phe Glu Glu Lys His Arg His Tyr Phe Asp
370 375 380

Phe Gln Arg Arg Thr Gly Asp Leu Pro Val Gln Lys Glu Gly Glu Glu
385 390 395 400

Val Asp Tyr Arg Asn Val Leu His Arg Asp Gly Ser Val Leu Met Ser
405 410 415

Ile Ser Leu Asp Gln Leu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Arg Ser Leu
420 425 430

Ala Thr Lys Leu Val Val Gly Met Pro Phe Lys Asp Leu Ala Thr Val
435 440 445

Asp Ser Ile Leu Leu Arg Glu Leu Pro Pro Val Asp Asp Gln Val Ala
450 455 460

Arg Leu Ala Leu Lys Arg Leu Ile Asp Val Ser Met Gly Val Ile Ala
465 470 475 480

Pro Leu Ser Glu Gln Leu Thr Lys Pro Leu Pro Asn Ala Met Val Leu
485 490 495

Val Asn Leu Lys Glu Leu Ser Gly Gly Ala Tyr Lys Leu Leu Pro Glu
500 505 510

Gly Thr Arg Leu Val Val Ser Leu Arg Gly Asp Glu Pro Tyr Glu Glu
515 520 525

Leu Glu Ile Leu Lys Asn Ile Asp Ala Thr Met Ile Leu His Asp Val
530 535 540

Pro Phe Thr Glu Asp Lys Val Ser Arg Val His Ala Ala Arg Arg Leu
545 550 555 560

Phe Glu Phe Leu Ser Glu Asn Ser Val Asn Phe Pro Val Ile His His
565 570 575

Ile Asn Phe Pro Thr Gly Ile His Arg Asp Glu Leu Val Ile His Ala
580 585 590

Gly Thr Tyr Ala Gly Gly Leu Leu Val Asp Gly Leu Gly Asp Gly Val
595 600 605

Met Leu Glu Ala Pro Asp Gln Asp Phe Asp Phe Leu Arg Asn Thr Ser
610 615 620

Phe Asn Leu Leu Gln Gly Cys Arg Met Arg Asn Thr Lys Thr Glu Tyr
625 630 635 640

Val Ser Cys Pro Ser Cys Gly Arg Thr Leu Phe Asp Leu Gln Glu Ile
645 650 655

Ser Ala Glu Ile Arg Glu Lys Thr Ser His Leu Pro Gly Val Ser Ile
660 665 670

Ala Ile Met Gly Cys Ile Val Asn Gly Pro Gly Glu Met Ala Asp Ala
675 680 685

Asp Phe Gly Tyr Val Gly Asp Ser Pro Gly Lys Ile Asp Leu Tyr Val
690 695 700

Gly Lys Thr Val Val Lys Arg Gly Ile Ala Met Thr Glu Ala Thr Asp
705 710 715 720

Ala Leu Ile Gly Leu Ile Lys Glu His Gly Arg Trp Val Asp Pro Pro
725 730 735

Val Ala Asp Glu
740

<210> 2

<211> 740

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

```
Met Ala Thr Gly Val Leu Pro Ala Pro Val Ser Gly Ile Lys Ile Pro
1               5                  10                  15

Asp Ser Lys Val Gly Phe Gly Lys Ser Met Asn Leu Val Arg Ile Cys
            20                  25                  30

Asp Val Arg Ser Leu Arg Ser Ala Arg Arg Arg Val Ser Val Ile Arg
        35                  40                  45

Asn Ser Asn Gln Gly Ser Asp Leu Ala Glu Leu Gln Pro Ala Ser Glu
    50                  55                  60

Gly Ser Pro Leu Leu Val Pro Arg Gln Lys Tyr Cys Glu Ser Leu His
65                  70                  75                  80

Lys Thr Val Arg Arg Lys Thr Arg Thr Val Met Val Gly Asn Val Ala
                85                  90                  95

Leu Gly Ser Glu His Pro Ile Arg Ile Gln Thr Met Thr Thr Ser Asp
            100                 105                 110

Thr Lys Asp Ile Thr Gly Thr Val Asp Glu Val Met Arg Ile Ala Asp
        115                 120                 125

Lys Gly Ala Asp Ile Val Arg Ile Thr Val Gln Gly Lys Lys Glu Ala
    130                 135                 140

Asp Ala Cys Phe Glu Ile Lys Asp Lys Leu Val Gln Leu Asn Tyr Asn
145                 150                 155                 160

Ile Pro Leu Val Ala Asp Ile His Phe Ala Pro Thr Val Ala Leu Arg
                165                 170                 175

Val Ala Glu Cys Phe Asp Lys Ile Arg Val Asn Pro Gly Asn Phe Ala
            180                 185                 190

Asp Arg Arg Ala Gln Phe Glu Thr Ile Asp Tyr Thr Glu Asp Glu Tyr
        195                 200                 205

Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Glu Gln Val Phe Thr Pro Leu Val Glu
    210                 215                 220
```

Lys Cys Lys Lys Tyr Gly Arg Ala Met Arg Ile Gly Thr Asn His Gly
225 230 235 240

Ser Leu Ser Asp Arg Ile Met Ser Tyr Tyr Gly Asp Ser Pro Arg Gly
245 250 255

Met Val Glu Ser Ala Phe Glu Phe Ala Arg Ile Cys Arg Lys Leu Asp
260 265 270

Tyr His Asn Phe Val Phe Ser Met Lys Ala Ser Asn Pro Val Ile Met
275 280 285

Val Gln Ala Tyr Arg Leu Leu Val Ala Glu Met Tyr Val His Gly Trp
290 295 300

Asp Tyr Pro Leu His Leu Gly Val Thr Glu Ala Gly Glu Gly Glu Asp
305 310 315 320

Gly Arg Met Lys Ser Ala Ile Gly Ile Gly Thr Leu Leu Gln Asp Gly
325 330 335

Leu Gly Asp Thr Ile Arg Val Ser Leu Thr Glu Pro Pro Glu Glu Glu
340 345 350

Ile Asp Pro Cys Arg Arg Leu Ala Asn Leu Gly Thr Lys Ala Ala Lys
355 360 365

Leu Gln Gln Gly Ala Pro Phe Glu Glu Lys His Arg His Tyr Phe Asp
370 375 380

Phe Gln Arg Arg Thr Gly Asp Leu Pro Val Gln Lys Glu Gly Glu Glu
385 390 395 400

Val Asp Tyr Arg Asn Val Leu His Arg Asp Gly Ser Val Leu Met Ser
405 410 415

Ile Ser Leu Asp Gln Leu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Arg Ser Leu
420 425 430

Ala Thr Lys Leu Val Val Gly Met Pro Phe Lys Asp Leu Ala Thr Val
435 440 445

Asp Ser Ile Leu Leu Arg Glu Leu Pro Pro Val Asp Asp Gln Val Ala
450 455 460

Arg Leu Ala Leu Lys Arg Leu Ile Asp Val Ser Met Gly Val Ile Ala
465 470 475 480

Pro Leu Ser Glu Gln Leu Thr Lys Pro Leu Pro Asn Ala Met Val Leu
485 490 495

Val Asn Leu Lys Glu Leu Ser Gly Gly Ala Tyr Lys Leu Leu Pro Glu
500 505 510

Gly Thr Arg Leu Val Val Ser Leu Arg Gly Asp Glu Pro Tyr Glu Glu
515 520 525

Leu Glu Ile Leu Lys Asn Ile Asp Ala Thr Met Ile Leu His Asp Val
530 535 540

Pro Phe Thr Glu Asp Lys Val Ser Arg Val His Ala Ala Arg Arg Leu
545 550 555 560

Phe Glu Phe Leu Ser Glu Asn Ser Val Asn Phe Pro Val Ile His His
565 570 575

Ile Asn Phe Pro Thr Gly Ile His Arg Asp Glu Leu Val Ile His Ala
580 585 590

Gly Thr Tyr Ala Gly Gly Leu Leu Val Asp Gly Leu Gly Asp Gly Val
595 600 605

Met Leu Glu Ala Pro Asp Gln Asp Phe Asp Phe Leu Arg Asn Thr Ser
610 615 620

Phe Asn Leu Leu Gln Gly Cys Arg Met Arg Asn Thr Lys Thr Glu Tyr
625 630 635 640

Val Ser Cys Pro Ser Cys Gly Arg Thr Leu Phe Asp Leu Gln Glu Ile
645 650 655

Ser Ala Glu Ile Arg Glu Lys Thr Ser His Leu Pro Gly Val Ser Ile
660 665 670

Ala Ile Met Gly Cys Ile Val Asn Gly Pro Gly Glu Met Ala Asp Ala
675 680 685

Asp Phe Gly Tyr Val Gly Gly Ser Pro Gly Lys Ile Asp Leu Tyr Val
690 695 700

Gly Lys Thr Val Val Lys Arg Gly Ile Ala Met Thr Glu Ala Thr Asp
705 710 715 720

Ala Leu Ile Gly Leu Ile Lys Glu His Gly Arg Trp Val Asp Pro Pro
725 730 735

Val Ala Asp Glu
740

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 267 390

(21) Nº de solicitud: 200501563

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **16.06.2005**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** ***C12N 15/29*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 0212478 A2 (MONSANTO TECNOLOGY LLC.) 14.02.2002	1-4,7

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	Examinador	Página
30.01.2007	M. Hernández Cuéllar	1/1