

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 477**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 9/08 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
A01H 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05768621 .4**
96 Fecha de presentación: **14.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1759005**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

54 Título: **MÉTODO PARA AUMENTAR LA RESISTENCIA A LOS PATÓGENOS EN PLANTAS
TRANSGÉNICAS MEDIANTE EXPRESIÓN DE UNA PEROXIDASA.**

30 Prioridad:
24.06.2004 DE 102004030608

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.01.2012

73 Titular/es:
**BASF PLANT SCIENCE GMBH
BPS - A30
67056 LUDWIGSHAFEN, DE**

72 Inventor/es:
**FRANK, Markus;
SCHMIDT, Ralf-Michael y
STAUDER, Sandra**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 371 477 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para aumentar la resistencia a los patógenos en plantas transgénicas mediante expresión de una peroxidasa

5 La presente invención se refiere a un método para la producción de plantas transgénicas y/o células transgénicas con elevada resistencia a los patógenos fúngicos, el cual se caracteriza porque se introduce en la planta y allí se expresa una secuencia de ADN, la cual codifica para una proteína con la actividad de una peroxidasa. Así mismo la presente invención se refiere al empleo de ácidos nucleicos que codifican para una peroxidasa, para la producción de plantas transgénicas o bien células transgénicas con una elevada resistencia a los patógenos fúngicos. Además, la presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos, que codifican para una peroxidasa de cebada.

10 Las enfermedades de las plantas que pueden ser causadas por diferentes patógenos como por ejemplo virus, bacterias y hongos, pueden conducir en los cultivos de plantas a considerables pérdidas en la cosecha, lo cual tiene por un lado consecuencias económicas, pero también amenazan la seguridad de la alimentación humana. Desde los últimos siglos, para el control de las enfermedades por hongos se han empleado fungicidas químicos. Mediante el empleo de estas sustancias pudo reducirse en verdad la magnitud de enfermedades vegetales, ciertamente hasta hoy no se descarta que estos compuestos ejercen un efecto dañino sobre el ser humano, animales y medio ambiente. De allí que para reducir en el largo plazo a un mínimo el consumo de agentes protectores convencionales para las plantas, es importante investigar el rechazo de diferentes plantas a los patógenos naturales respecto a diferentes agentes y aprovecharlos de modo específico para la producción de plantas resistentes a los patógenos, mediante manipulación tecnológica de genes, por ejemplo mediante la introducción de genes externos de resistencia o mediante la manipulación de la expresión endógena de genes en las plantas.

20 Se define como resistencia a la capacidad de una planta para impedir o por lo menos para limitar el ataque y asentamiento por un agente del deterioro.

25 En las resistencias que ocurren de modo natural, con las cuales las plantas se defiende contra la colonización por organismos fitopatógenos, pueden diferenciarse diversos mecanismos. Estas interacciones específicas entre patógenos y huésped determinan el transcurso de la infección (Schopfer y Brennicke (1999) Pflanzenphysiologie, editorial Springer, Berlin-Heidelberg).

30 En relación con la resistencia específica a cepas, que también se denomina resistencia de huésped, se diferencia entre la interacción compatible y la incompatible. En la interacción compatible están para la interacción un patógeno virulento con una planta susceptible. El patógeno sobrevive y puede formar estructuras de multiplicación, por el contrario de huésped muere. En contraste, se habla de una interacción incompatible, cuando el patógeno infecta específicamente la planta, sin embargo inhibe en su crecimiento antes o después de ligeras manifestaciones de síntomas. En este caso la planta es resistente frente al respectivo agente (Schopfer y Brennicke (1999) Pflanzenphysiologie, editorial Springer, Heidelberg). Tanto en la interacción compatible como también la interacción incompatible tiene lugar una reacción de defensa del huésped frente al patógeno.

35 Las bases genéticas para las interacciones compatible o bien incompatible huésped/patógeno fueron descritas mediante la hipótesis gen-por-gen (Flor (1971) Annu. Rev. Phytopathology 9: 275 296). El prerrequisito para el reconocimiento del patógeno específico para la raza es la interacción directa o indirecta del producto de genes de resistencia dominante o semi-dominante (gen R) de la planta con un producto, el cual desciende del gen avirulento complementario y dominante (gen Avr) del fitopatógeno (Keen (1992) Annu. Rev. Genet. 24: 447 - 463; Staskawicz et al. (1995) Science 268: 661 - 667). Por el contrario cuando el agente de la enfermedad pierde el gen avirulento complementario, puede desencadenarse la enfermedad. El modelo gen-por-gen se ha comprobado para muchas infecciones de orín, quemadura, verdaderas así como falsas por oídio, sin embargo no es aplicable para todas las interacciones parásito-huésped.

45 Sin embargo, en la naturaleza esta resistencia específica a la cepa es vencida frecuentemente debido al rápido desarrollo evolutivo de los patógenos (Neu et al. (2003) American Cytopathol. Society, MPMI 16 Nr. 7: 626 - 633). Por el contrario la resistencia de no huésped confiere una protección fuerte, amplia y duradera contra los fitopatógenos. Se entiende por la resistencia de no huésped al fenómeno según el cual un patógeno en una determinada especie de planta puede causar una enfermedad, aunque no en otra especie de planta genéticamente similar (Heath (2002) Can. J. Plant Pathol. 24: 259 - 264).

50 Aunque éstas interesantes propiedades son las bases genéticas y biológico-moleculares para la resistencia de no huésped, hasta ahora son sólo poco entendidas. Existe tanto evidencia de que la resistencia de no huésped es inducida por sustancias no específicas como también de que proteínas individuales de patógenos en el tipo de la interacción gen-por-gen promueven la reacción de resistencia de no huésped (Heath (1981) Phytopathology 71: 1121 - 1123; Heath (2001) Physiol. Mol. Plant Pathol. 58: 53 - 54; Kamoun et al. (1998) Plant Cell 10: 1413 - 1425; Lauge et al. (2000) Plant J. 23: 735 - 745; Whalen et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6743 - 6747).

Otra base por la cual sólo esporádicamente ocurre la colonización de plantas por fitopatógenos, es que debido a una carencia de sustancias y estructuras que son necesarias en el curso de la infección, el patógeno no puede formar estructuras de infección. Además, barreras de resistencia preformadas o inducidas de modo no específico, las cuales ya están presentes antes de la infección por un patógeno, pueden también impedir la formación de estructuras de infección. Esta resistencia es definida como resistencia base o resistencia no específica de cepa y es mantenida mediante mecanismos de defensa pasivos y activos.

Los diferentes mecanismos de resistencia que son responsables por la resistencia o sensibilidad de un tipo de planta o sus variedades cultivadas frente a determinados patógenos de plantas, deberían por ejemplo ser representados para el agente de oídio (*Blumeria graminis*), el cual invade varios cereales diferentes. El hongo de oídio pertenece a la especie de los *Ascomycetes* e infecta además de trigo y cebada también centeno, avena y numerosas hierbas. Las pérdidas de rendimiento causadas en cebada y trigo pueden ascender en casos individuales hasta 25%. Por regla general que ellas están entre 5 y 15%. Además el oídio crea un puerto de acceso para otros agentes de enfermedades (hongo de cáncer, marrón de espelta, ataque de hoja de, etc.). El síntoma más notorio de enfermedad de una infección por oídio son las "pústulas de oídio" blanco, las cuales se presentan predominantemente sobre el lado superior de la hoja y la vaina de la hoja. El verdadero oídio, *Blumeria graminis*, es biotrofo obligado, es decir él puede alimentarse sólo de sustancias vivas y no puede ser cultivado sobre medios nutritivos. En lugar de eso, el hongo influye el metabolismo de huésped de modo que promueve su propio crecimiento (Ferrari et al. (2003) The Plant Journal 35: 193 - 205). El hongo de oídio invade exclusivamente la capa de células de la epidermis de hojas de cebada. El hongo penetra las células de la planta a través de la pared celular de modo mecánico y enzimático, por medio de un espigón de penetración que son conidias, es decir esporas formadas asexualmente. El ataque exitoso de hojas de cebada es logrado cuando se ha formado la haustoria, que es el órgano fúngico de manutención. Las haustorias privan de sus nutrientes a las células de las plantas, en lo que las células vecinas no infectadas compensan esta pérdida de nutrientes y se mantienen vivas mediante ello. Mediante el flujo de nutrientes en las células deterioradas se asegura el hongo una base de supervivencia por un cierto tiempo.

El hongo de oídio como tipo abarca varias formas especiales dependiendo de si el respectivo hongo de oídio ataca por ejemplo trigo o cebada. En el caso del ataque de cebada se trata de *Blumeria graminis f. sp. hordei*, mientras que en el ataque de trigo se trata de *Blumeria graminis f. sp. tritici*. Además, dentro de las diferentes formas especiales, pueden identificarse diversas cepas o patotipos, los cuales respecto a diferentes variedades cultivadas de clases de huésped exhiben una diferente resistencia. Las respectivas formas especiales atacan en cada caso sólo determinado tipo de planta, sin embargo no otras plantas parientes cercanas. Con esto se trata de una resistencia de no huésped de las plantas, las cuales no son atacadas por una determinada forma especial.

Pueden diferenciarse varios diversos mecanismos genéticos que le confieren resistencia a la cebada respecto al oídio. La resistencia específica a la cepa se fundamenta en genes de resistencia (genes R) contra el verdadero oídio de cebada, los cuales son efectivos sólo contra aislados individuales del hongo *Blumeria graminis f. sp. hordei*, porque cada gen R individual, como ya se mencionó arriba, sólo reconoce aquel aislado que porta un gen complementario de avirulencia (Collins et al. (2002) The Powdery Mildew Accomprehensive Treatise, American Phytopathological Society, Minnesota; Peterhänsel et al. (1997) Plant Cell 9: 1397 - 1409). En contraste con ello se controla la amplia resistencia no específica a la cepa respecto a varios aislados de oídio mediante un gen recesivo individual, el cual se definió como gen Mlo (Schulze-Lefert y Vogel (2000) Trends in Plant Science 5: 343 - 348). Una hipótesis actual para la eficacia del gen Mlo es que la proteína tipo silvestre Mlo es un regulador negativo de la reacción de defensa y de allí que la falta de proteína causa una rápida y fuerte reacción de defensa, de lo cual resulta una efectiva defensa al patógeno (Collins et al. (2002), vide supra). La resistencia ayudada por Mlo conduce a la formación de una aposición subcelular de la pared de la célula, la cual se define como papila y se forma directamente debajo del espolón fúngico de penetración, el así denominado appressorium. De allí que se inhiben los intentos de penetración del hongo en la etapa de la formación de papila, es decir no está para la formación de una haustoria, lo cual es necesario para la provisión de nutrientes del hongo y con ello para el establecimiento de un eficiente ataque.

En contraste con la resistencia no específica a la cepa, en la resistencia de no huésped de la cebada respecto al verdadero oídio *Blumeria graminis f. sp. tritici* (Bgt), se ataca al trigo pero no a la cebada, induce mecanismos parecidos de defensa como en una inoculación de cebada como una forma avirulenta de *Blumeria graminis f. sp. Hordei* (Bgh). Puesto que la resistencia de no huésped es fuerte, amplia y duradera, es de gran interés identificar los genes que son responsables por la resistencia de no huésped. Mediante ello podría explotarse agrónomicamente la resistencia de no huésped de la cebada, para otros sistemas patógeno-huésped. De allí que existe una necesidad de plantas o bien células de plantas que expresen genes que imparten resistencia de no huésped y con ello muestran una elevada resistencia respecto a agentes fúngicos, como por ejemplo oídio.

Es un objetivo de la presente invención poner a disposición plantas o bien células de plantas transgénicas, que exhiben una elevada resistencia respecto a patógenos fúngicos. Además es un objetivo de la presente invención poner a disposición plantas o bien células de plantas con una resistencia de no huésped respecto a diferentes patógenos fúngicos como por ejemplo oídio. Además es un objetivo de la presente invención poner a disposición

métodos que hagan posible la producción de las plantas o bien células de plantas transgénicas arriba mencionadas, con una elevada resistencia (de no huésped) respecto a patógenos fúngicos vegetales, como por ejemplo oídio.

Además es un objetivo de la presente invención poner a disposición secuencias de ADN, con las cuales pueden identificarse plantas que exhiben una resistencia de no huésped frente a patógenos fúngicos.

- 5 Para solucionar este y otros objetivos, como resultan de la descripción, sirven las características de las reivindicaciones independientes.

Las formas preferidas de operar de la invención son definidas mediante las características de las reivindicaciones que se encuentran abajo.

- 10 En el marco de la presente invención se descubrió que en la interacción de la cebada con *Blumeria graminis sp. tritici* se induce específicamente una peroxidasa, que participa en el otorgamiento de la resistencia de no huésped frente a esta *forma specialis* del oídio.

- 15 De allí que los mencionados objetivos de la presente invención son solucionados esencialmente poniendo a disposición un método para la producción de plantas transgénicas con elevada resistencia a patógenos fúngicos, el cual se caracteriza porque se incorpora en una planta una secuencia de ADN, la cual codifica para una proteína con la actividad de una peroxidasa, y allí se expresa.

- 20 En la presente invención se identificaron genes mediante estudios de huella de oligonucleótidos, los cuales en la interacción de la cebada con *Bgt* en comparación con la interacción de la cebada con *Bgh* así como con los controles, fueron activados transcripcionalmente. En el resultado se confirmó este patrón de expresión de gen mediante diferentes métodos de biología molecular y se determinó la secuencia de longitud total del gen inducido más fuertemente. A continuación se identificó este gen como peroxidasa y se definió como HvBgt1. La expresión del HvBgt1 se eleva fuertemente en la reacción de no huésped de la cebada con *Bgt* después de 24 horas, mientras que en la reacción de huésped (cebada con *Bgh*) en la totalidad del transcurso se reconoce sólo un pequeño aumento de la expresión (vgl. Tab. 5 y Abb. 1).

- 25 Las peroxidasas son enzimas mediante las cuales el peróxido de hidrógeno, como aceptor de moléculas de hidrógeno de compuestos orgánicos, es reducido hasta agua. En las plantas corresponden a las peroxidasas una función importante en la síntesis de la pared celular y en la desintoxicación de sustancias xenobióticas. Durante la infección con patógeno se forman especies reactivas al oxígeno que pueden ser desventajosas para la planta. Se asume que estas peroxidasas transforman enzimáticamente estas especies reactivas al oxígeno y mediante ello se les hace inocuas. En la WO 02/07023 se describen peroxidasas de maíz y su empleo para la producción de plantas transgénicas con elevada resistencia a los patógenos fúngicos. De allí que es objetivo de la presente invención una molécula aislada de ácido nucleico, la cual contiene una secuencia de ácido nucleico elegida de entre el grupo consistente en:

- 30 i) secuencias de ADN que abarcan secuencias de nucleótidos, que son codificadas de SEQ ID No. 1,
 35 ii) secuencias de ADN que abarcan secuencias de nucleótidos, que codifican para una proteína con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID No. 2,
 iii) secuencias de ADN, que exhiben en la totalidad de la secuencia una identidad de secuencia de por lo menos 80% con la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID No. 1

y codifica para una proteína con la actividad de una peroxidasa.

Preferiblemente la secuencia de ácido nucleico proviene de *Hordeum vulgare*.

- 40 Otro objetivo de la presente invención son proteínas que son codificadas, mediante las moléculas de ácido nucleico previamente mencionadas.

También es objetivo de la presente invención un método para la producción de plantas o bien células de plantas transgénicas con elevada resistencia a los patógenos fúngicos, caracterizado porque una secuencia de ADN elegida de entre grupo consistente en:

- 45 i) secuencias de ADN que incluyen secuencias de nucleótidos, que son codificados de SEQ ID No. 1 o,
 ii) secuencias de ADN que abarcan secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID No. 2,

iii) secuencias de ADN, que en la totalidad de la secuencia exhiben una identidad de secuencia de por lo menos 80 por ciento comparada con la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID No. 1, las cuales codifican para una proteína con la actividad de una peroxidasa, son introducidas en la planta o bien células de la planta y se expresan allí.

5 Otro objetivo de la presente invención son moléculas de ácido nucleico recombinante, que en una orientación 5'-3' abarcan:

- secuencias reguladoras de un promotor activo en células de plantas,

- secuencias de ácido nucleico ligadas allí de modo operativo como se indicó arriba,

10 - dado el caso secuencias reguladoras ligadas allí de modo operativo, que pueden servir en las células de plantas como señales de transcripción, de terminación y/o de poloadenilación.

Así mismo son objetivos de la presente invención plantas o bien células de plantas transgénicas, que fueron producidas según uno de los métodos acorde con la invención y que en comparación con el tipo silvestre están dotadas con una elevada resistencia a los patógenos fúngicos y un contenido elevado de peroxidasa.

15 Así mismo es objetivo de la presente invención el empleo de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la invención para la producción de plantas y células de plantas transgénicas con elevada resistencia a los patógenos fúngicos.

Otro objetivo de la invención es el empleo de una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la invención para la identificación de plantas, que muestran una resistencia de no huésped frente a los patógenos fúngicos.

20 "Resistencia a los patógenos fúngicos" significa que reduce o debilita los síntomas de enfermedad de una planta resultantes de un ataque por un hongo patógeno. Los síntomas pueden ser de varios tipos, incluyendo preferiblemente aquellos que conducen directa o indirectamente a un deterioro de la calidad de las plantas, de la cantidad del rendimiento, de la adecuación para el empleo como agentes alimentarios nutricionales o también dificulta la siembra, cultivo, cosecha o procesamiento del bien de cosecha.

25 De acuerdo con la invención, se entiende bajo el concepto "elevada resistencia a los patógenos fúngicos" que las plantas o bien células de plantas transgénicas acordes con la invención son atacadas con menos fortaleza y/o menos frecuencia que las plantas o bien células de plantas de tipo silvestre no transformadas que fueron tratadas en otros aspectos del mismo modo (por ejemplo condiciones de clima y condiciones de cultivo, tipo de patógeno, etc.). Preferiblemente el ataque con patógenos es reducido en un factor de por lo menos 2, de modo particular preferiblemente por lo menos en un factor de 3, en particular preferiblemente por lo menos en un factor de 5 y más
30 preferiblemente por lo menos en un factor de 10, lo cual se expresa en una reducción de la formación de síntomas de enfermedad. Una posibilidad, cuantificar el ataque de patógenos, ofrece la eficiencia de penetración (ver ejemplo 9). El concepto "elevada resistencia a los patógenos" contiene también en ello una así denominada resistencia transitoria a los patógenos, es decir que las plantas o bien células de las plantas transgénicas acordes con la invención exhiben sólo por un limitado período de tiempo una elevada resistencia a los patógenos respecto al
35 correspondiente tipo silvestre.

Los "patógenos fúngicos" pueden ser todos los agentes fúngicos que atacan normalmente las plantas de tipo silvestre, como por ejemplo oídio. También se acepta que la sobreexpresión de una secuencia empleada acorde con la invención también causa una resistencia frente a otros patógenos.

40 Los patógenos fúngicos o los patógenos similares a los hongos (como por ejemplo Chromista) provienen preferiblemente del grupo que abarca plasmodioforomicota, oomicota, ascomicota, quitridiomycetos, cigomicetos, basidiomicota y deuteromicetos (Fungi imperfecti). Por ejemplo, aunque sin ser limitante, son de mencionar los patógenos fúngicos nombrados en la tabla 1 y las enfermedades relacionadas con ellos.

Tabla 1: Enfermedades de plantas por hongos

Enfermedad	Patógeno
Roya parda	<i>Puccinia recondita</i>
Roya amarilla	<i>P. striiformis</i>
Oídio verdadero	<i>Erysiphe graminis</i> / <i>Blumeria graminis</i>
Gluma marrón	<i>Septoria nodorum</i>
Mancha de escaldadura	<i>Septoria tritici</i>
Fusariosis de la espiga	<i>Fusarium</i> spp.
Enfermedad de paja rota	<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>
Tizón	<i>Ustilago</i> spp.
Tizón del trigo	<i>Tilletia caries</i>
Bifurcación negra	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Antracnosis de tizón de la hoja Antracnosis de pudrición del tallo	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorph: <i>Glomerella</i> graminicola Politis); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorph: <i>Glomerella falcata</i> Went)
Aspergillus oídio y podredumbre del grano	<i>Aspergillus flavus</i>
Hoja bandeada y mancha de vaina	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn = <i>Rhizoctonia</i>
("Asesino de la raíz")	<i>microsclerotia</i> J. Matz (telomorph: <i>Thanatephorus cucumeris</i>)
Enfermedad del bulto negro	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams = <i>Cephalosporium acremonium</i> Auct. non Corda
Podredumbre negra del grano	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> = <i>Botryodiplodia theobromae</i>
Borde blanco	<i>Marasmiellus</i> sp.
Mancha marrón (punto negro, la pudrición del tallo)	<i>Physoderma maydis</i>
Podredumbre del grano <i>Cephalosporium</i>	<i>Acremonium strictum</i> = <i>Cephalosporium acremonium</i>
Podredumbre de carbón	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Podredumbre <i>Corticium</i>	<i>Thanatephorus cucumeris</i> = <i>Corticium sasakii</i>

ES 2 371 477 T3

(continuación)

Enfermedad	Patógeno
Mancha de la hoja curvularia	<p>Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans</p> <p>(teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia</p> <p>inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Cochliobolus</p> <p>intermedius), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens</p> <p>(teleomorph: Cochliobolus pallescens), Curvularia</p> <p>senegalensis, C. tuberculata (teleomorph: Cochliobolus tuberculatus)</p>
Mancha de la hoja didimela	Didymella exitalis
Pudrición diplodia y pudrición del tallo	Diplodia frumenti (teleomorph: Botryosphaeria festucae)
Pudrición diplodia, pudrición del tallo, podredumbre de la semilla y tizón de la plántula	Diplodia maydis = Stenocarpella maydis
Raya o mancha de la hoja diplodia	Stenocarpella macrospora = Diplodialeaf macrospora
Raya vellosa café mildiu	Sclerophthora rayssiae var. zeae
Vellosidad loca superior mildiu	Sclerophthora macrospora = Sclerospora macrospora
Verde oídio mildiu (graminicola mildiú vellosa)	Sclerospora graminicola
Vellosidad Java mildiu	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
Vellosidad filipina mildiu	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
Vellosidad mildiu del sorgo	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
Vellosidad mildiu Spontaneum	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
Vellosidad mildiu de caña de azúcar	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
Pudrición seca (mazorca, grano y pudrición del tallo)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)

(continuación)

Enfermedad	Patógeno
Pudrición menor	<p>Alternaria alternata = A. tenuis, Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Botrytis cinerea (teleomorph: Botryotinia fuckeliana), Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydicus, Rhizopus microsporus Tiegh., R. stolonifer = R. nigricans, Scopulariopsis brumptii</p>
Cornezuelo de centeno (diente de caballo)	Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.)
Mancha ocular	Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae
Pudrición del tallo fusarium	Fusarium subglutinans = F. moniliforme var.subglutinans
Podredumbre del grano por Fusarium, la raíz y el tallo, podredumbre de semillas y plántulas	Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi)
Pudrición del tallo, de la raíz y de las plántulas por Fusarium	Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea)
Pudrición del tallo por Gibberella (Inflorescencia y pudrición del tallo)	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
Pudrición gris	Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)
Mancha gris en la hoja (mancha de Cercospora en la hoja)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeamaydis
Pudrición de la raíz por Helminthosporium	Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)

(continuación)

Enfermedad	Patógeno
Pudrición por Hormodendrum (pudrición por Cladosporium)	(Cladosporium rot) Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
Mancha de la hoja Hyalothyridium	Hyalothyridium maydis
Marchitez tardía	Cephalosporium maydis
Manchas en las hojas, menores	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium Victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina
Tizón en la hoja del maiz del norte (explosión de color blanco, podredumbre de la corona del tallo, banda)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum)
Mancha por pudrición Helminthosporium en la hoja del maiz del norte (raza 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
Pudrición por Penicillium (ojo azul, el moho azul)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum

ES 2 371 477 T3

(continuación)

Enfermedad	Patógeno
Pudrición del tallo y pudrición de la raíz Phaeocystostroma	Phaeocystostroma ambiguum, = Phaeocystosporella zeae
Mancha de la hoja Phaeosphaeria	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
Pudrición por Physalospora (pudrición por Botryosphaeria)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
Vaina de la hoja púrpura	Bacterias y hongos hemiparasíticos
Pudrición del tallo y la raíz por Pyrenochaeta	Phoma terrestris = Pyrenochaeta terrestris
Pudrición de la raíz por Pythium	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
Pudrición del tallo por Pythium	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
Enfermedad roja del núcleo (pudrición de la hoja y de la semilla)	Epicoccum nigrum
Pudrición por Rhizoctonia (podredumbre esclerotial)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
Pudrición de la raíz y pudrición del tallo por Rhizoctonia	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae
Pudrición de la raíz, menor	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus

ES 2 371 477 T3

(continuación)

Enfermedad	Patógeno
Mancha de la hoja por Rostratum (enfermedad de la hoja Helminthosporium, la pudrición del tallo Helminthosporium)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = He/minthosporium rostratum)
Orín, maíz común	Puccinia sorghi
Orín, maíz del sur	Puccinia polysora
Orín, maíz tropical	Physopella pallescens, P. zae = Angiopsora zae
Pudrición por Sclerotium (tizón del sur)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
Podredumbre de la semilla de plántulas	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicellatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zae (anamorph: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
Mancha de la hoja por Selenophoma	Selenophoma sp.
Podredumbre de la vaina	Gaeumannomyces graminis
Podredumbre del hollejo	Myrothecium gramineum
Hongo de ensilaje	Monascus purpureus, M ruber
Tizón, comun	Ustilago zae = U. maydis
Tizón, falso	Ustilaginoidea virens
Tizón de la cabeza	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi

(continuación)

Enfermedad	Patógeno
Tizón en la hoja del maíz del sur y pudrición del tallo	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> (anamorph: <i>Bipolaris maydis</i> = <i>Helminthosporium maydis</i>)
Mancha en la hoja del sur	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodia macrospora</i>
Pudriciones del tallo, menores	<i>Cercospora sorghi</i> , <i>Fusarium episphaeria</i> , F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: <i>Nectria haematococca</i>), F. tricinctum, <i>Mariannaea elegans</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Rhopoglyphus zeae</i> , <i>Spicaria</i> sp.
Pudrimiento de almacenaje	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp. and other fungi
Macha de alquitrán	<i>Phyllachora maydis</i>
Pudrición de la raíz por <i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma viride</i> = T. lignorum teleomorph: <i>Hypocrea</i> sp.
Pudrición blanca de la raíz y el tallo	<i>Stenocarpella maydis</i> = <i>Diplodia zeae</i>
Tizón de la hoja amarilla	<i>Ascochyta ischaemi</i> , <i>Phyllosticta maydis</i> (teleomorph: <i>Mycosphaerella zeae-maydis</i>)
Mancha zonificada de hoja	<i>Gloeocercospora sorghi</i>

De modo particular preferiblemente la peroxidasa causa una resistencia respecto a

- 5 - Plasmodioforomicota como *Plasmodiophora brassicae* (hernia de la col, raíz en garrote de crucíferas), *Spongospora subterranea* (costra virulenta de tubérculos de patata), *Polymyxa graminis* (enfermedad de la raíz de cereales y pastos);
- 10 - Oomicota como *Bremia lactucae* (falso oídio en lechuga), *Peronospora* (falso oídio) en boca de dragón (*P. antirrhini*), cebolla (*P. destructor*), espinacas (*P. effusa*), grano de soya (*P. manchurica*), tabaco ("hongo azul" = moho azul; *P. tabacina*) alfalfa y trébol (*P. trifolium*), *Pseudoperonospora humuli* (falso oídio en lúpulo), *Plasmopara* (falso oídio en uvas) (*P. viticola*) y girasol (*P. halstedii*), *Sclerophthora macrospora* (falso oídio en cereales e hierbas), *Pythium* (podredumbre de semillas, marchitamiento fúngico de plántulas, y pudrición de la raíz y todos los tipos de plantas, por ejemplo quemadura de la raíz en betarraga por *P. debaryanum*), *Phytophthora infestans* (pudrimiento de hierba y bulbos en patata, pudrimiento marrón en tomate etc.), *Albugo spec.* (orín blanco en plantas crucíferas);
- 15 - Ascomycota como *Microdochium nivale* (moho de nieve en centeno y trigo), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (pudrimiento de espigas en trigo), *Fusarium oxysporum* (marchitamiento por *Fusarium* en tomate), *Blumeria graminis* (verdadero oídio en cebada (f.sp. *hordei*) y trigo (f.sp. *tritici*)), *Erysiphe pisi* (oídio de guisante), *Nectria galligena* (cáncer de árboles frutales), *Uromyces necator* (verdadero oídio de la vid), *Pseudopeziza tracheiphila* (podrido quemado de la vid), *Claviceps purpurea* (grano madre por ejemplo en centeno e hierbas),
- 20 *Gaeumannomyces graminis* (bifurcación negra en trigo, centeno entre otras hierbas), *Magnaporthe grisea* (enfermedad de la explosión del arroz), *Pyrenophora graminea* (enfermedad de raya en cebada), *Pyrenophora teres* (enfermedad de red de marchas en cebada), *Pyrenophora tritici-repentis* (enfermedad de manchas en las hojas (sequía de la hoja) en trigo), *Venturia inaequalis* (costra de manzana), *Sclerotinia sclerotium* (blancura del tallo, cáncer de colza), *Pseudopeziza medicaginis* (costra de pico en alfalfa, trébol blanco y rojo);

5 - Basidiomicetos como *Typhula incarnata* (putrefacción por *Typhula* en cebada, centeno, trigo), *Ustilago maydis* (gangrena de hinchazón en maíz), *Ustilago nuda* (gangrena de vuelo en cebada), *Ustilago tritici* (gangrena de vuelo en trigo, espelta), *Ustilago avenae* (gangrena del vuelo en avena), *Rhizoctonia solani* (asesino de la raíz en patatas), *Sphacelotheca* spp. (cabeza desnuda de sorgo), *Melampsora lini* (óxido de lino), *Puccinia graminis* (óxido negro en trigo, cebada, centeno, avena), *Puccinia recóndita* (óxido marrón en trigo), *Puccinia dispersa* (óxido marrón en centeno), *Puccinia hordei* (óxido marrón en cebada), *Puccinia coronata* (óxido de coronas en avena), *Puccinia striiformis* (óxido amarillo en trigo, cebada, centeno así como numerosas hierbas), *Uromyces appendiculatus* (óxido de granos), *Sclerotium rolfsii* (pudrición de la raíz y tallo de muchas plantas);

10 - Deuteromicetos (Fungi imperfecti) como *Septoria nodorum* (gluma marrón) en trigo (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (enfermedad de paja rota en trigo, cebada, centeno), *Rynchosporium secalis* (enfermedad de manchas en las hojas en centeno y cebada), *Alternaria solani* (enfermedad de manchas secas en patata, tomate), *Phoma betae* (quemadura de la raíz en betarraga), *Cercospora beticola* (enfermedad de mancha en la hoja por *Cercospora* en betarraga), (*Alternaria brassicae* (negro de colza en colza, col entre otras plantas crucíferas), *Verticillium dahliae* (marchitamiento de colza y putrefacción de tallos de colza), *Colletotrichum lindemuthianum* (enfermedad de manchas quemadas en judías), *Phoma lingam* – marchitamiento fúngico (befedad negra en col; putrefacción del cuello de la raíz o putrefacción del tallo en colza), *Botrytis cinerea* (moho gris en vid, fresa, tomate, lúpulo, etc.).

20 Se prefieren al máximo las plantas producidas mediante el método acorde con la invención resistentes contra *Phytophthora infestans* (putrefacción del bulbo e hierba, putrefacción marrón en tomate etc.), *Microdochium nivale* (anteriormente *Fusarium nivale*; moho de nieve en centeno y trigo), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (putrefacción espigas en trigo), *Fusarium oxysporum* (marchitamiento por *Fusarium* en tomate), *Blumeria graminis* (verdadero oídio en cebada (f. sp. *hordei*) y trigo (f. sp. *tritici*)), *Magnaporthe grisea* (enfermedad de la explosión de arroz), *Sclerotinia sclerotium* (blancura del tallo, cáncer de colza), *Septoria nodorum* y *Septoria tritici* (gluma marrón en trigo), *Alternaria brassicae* (negro de colza en colza, col entre otras crucíferas), *Phomalingam* (marchitamiento fúngico, befedad negra en col; putrefacción del cuello de la raíz o putrefacción del tallo en colza).

25 En tipos agrícolas individuales particularmente importantes la peroxidasa empleada acorde con la invención actúa preferiblemente contra los siguientes patógenos:

En cebada contra el hongo patógeno *Puccinia graminis* f.sp. *hordei* (orin del tallo de cebada), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *hordei* (mildiú pulverulento de cebada).

30 En los granos de soya contra los patógenos fúngicos *Phytophthora megasperma* fsp. *glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojae*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, , *Microsphaera diffusa*, *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, *Glomerella glycines*, *Phakopsorapachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, *Fusarium solani* .

35 En canola contra los patógenos fúngicos *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.

40 En alfalfa contra los patógenos fúngicos *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrochila medicaginis*, *Fusarium*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.

45 En trigo contra los patógenos fúngicos *Urocystis agropyri*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Colletotrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recóndita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, , *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*, *Pythium aphanidermatum*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (orín del tallo de trigo), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *tritici* (mildiú pulverulento blanco en trigo). En los granos de soya contra los patógenos fúngicos *Plasmophora halstedii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Septoria helianthi*, *Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*, *Botrytis cinerea*, *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*, *Erysiphe cichoracearum*,
55 *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium dahliae*, *Cephalosporium acremonium*, *Phytophthora cryptogea*, *Albugo tragopogonis*.

En maíz contra los patógenos fúngicos *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Fusarium moniliforme*, *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Stenocarpella maydi* (*Diplodia maydis*), *Pythium irregulare*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris maydis* 0,T(*Cochliobolus heterostrophus*), *Helminthosporium carbonum* I,II&III (*Cochliobolus carbonum*), *Exserohilum turcicum* I, II & III, *Helminthosporium pedicellatum*, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*, *Kabatiella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallescens*, *Trichoderma viride*, *Claviceps sorghi*, *Diplodia macrospora*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinesis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Spacelotheca reiliana*, *Physopella zeae*, *Cephalosporium maydis*, *Cephalosporium acremonium*.

En sorgo contra los patógenos fúngicos *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Perconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Sclerospora graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*.

De acuerdo con la invención, se entiende por "tipo silvestre" el organismo de partida correspondiente no modificado genéticamente.

Mediante el método acorde con la invención se induce una elevación del contenido de peroxidasa en una planta o bien células de planta transgénicas. Esta elevación del contenido asciende a por lo menos 5%, preferiblemente por lo menos 20%, así mismo preferiblemente por lo menos 50%, de modo particular preferiblemente por lo menos 100%, asimismo de modo particular preferiblemente por lo menos en un factor de 5, en particular preferiblemente por lo menos en un factor de 10, asimismo en particular preferiblemente por lo menos en un factor de 50 y lo más preferiblemente en un factor de 100.

Bajo el concepto "fragmentos de ADN", como se emplea acá, se entienden piezas del ADN, que codifican para una proteína que posee una actividad de una peroxidasa, donde las proteínas codificadas por las piezas de ADN exhiben esencialmente la misma actividad de peroxidasa que las proteínas codificadas por la secuencia completa de ADN y con estos fragmentos se obtiene el aumento acorde con la invención de la resistencia a los patógenos en plantas transgénicas.

El concepto "fragmento de la proteína" como se emplea aquí, define piezas de proteína que poseen la actividad de una peroxidasa, donde la pieza de proteína exhibe esencialmente la misma actividad de peroxidasa que la proteína en su longitud total y con estos fragmentos se alcanza la elevación de la resistencia a los patógenos en plantas transgénicas acorde con la invención.

Se entiende por esencialmente la misma actividad enzimática de la peroxidasa empleada en el método acorde con la invención, que la actividad enzimática respecto a las enzimas codificadas por la secuencia con SEQ ID No. 1 y sus derivados, en comparación es por lo menos 50%, preferiblemente por lo menos 60%, de modo particular preferiblemente por lo menos 70% y muy particularmente preferiblemente por lo menos 80% y lo más preferiblemente por lo menos 90%. Con ello, las peroxidosas con esencialmente la misma actividad enzimática son adecuadas para causar una elevada resistencia a los patógenos en plantas transgénicas.

Se determina la actividad de peroxidasa mediante métodos sencillos, que son conocidos por los expertos, por ejemplo con la medición de actividad guayacol-peroxidasa (Chance y Maehley (1955) *Method Enzymol.* 11: 764-775) o con la medición de actividad de Syringaldazin (Pandolfini et al. (1992) *Plant Cell Environ.* 15: 719-725).

El concepto "ácido nucleico(molécula)", como se emplea aquí, abarca además en una forma preferida de operar la secuencia no traducida localizada en los extremos 3'- y 5' del rango de gen que codifica: por lo menos 500, preferiblemente 200, de modo particular preferiblemente 100 nucleótidos de la secuencia corriente arriba del extremo 5' del rango que codifica y por lo menos 100, preferiblemente 50, de modo particular preferiblemente 20 nucleótidos de la secuencia corriente abajo del extremo 3' del rango de gen que codifica. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es separada de otras moléculas de ácido nucleico, las cuales están presentes en las fuentes naturales del ácido nucleico. Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" no tiene secuencias que flanqueen de modo natural el ácido nucleico en el ADN genómico del organismo del cual se origina el ácido nucleico (por ejemplo secuencias que se encuentran en los extremos 5'- y 3' del ácido nucleico). En diferentes formas de operar, la molécula aislada de peroxidasa puede contener por ejemplo menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos, que flanquean de modo natural la molécula de ácido nucleico en el

ADN genómico de las células en las cuales se origina el ácido nucleico. Todas las moléculas de ácido nucleico aquí mencionadas pueden ser por ejemplo ARN, ADN o cADN.

Las moléculas de ácido nucleico empleadas en el método, por ejemplo una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 1, pueden ser aisladas empleando técnicas estándar de biología molecular y la información de secuencia aquí puesta a disposición. También por ejemplo con ayuda de algoritmos de comparación, como se encuentran por ejemplo en la NCBIHomepage bajo <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, puede identificarse una secuencia homóloga o rango de secuencia homóloga conservada de planos de ADN- o aminoácidos. Partes esenciales de esa secuencia o la secuencia homóloga total pueden ser empleadas como sondas de hibridación usando las técnicas estándar de hibridación (como se describen por ejemplo en Sambrook et al., vide supra), para el aislamiento de otras secuencias de ácido nucleico de otros organismos útiles en el método mediante el tamizaje de cADN y/o bancos genómicos. Además se aísla una molécula de ácido nucleico, que abarca una secuencia total de la SEQ ID No. 1 o una parte de ella, mediante reacción de cadena de polimerasa, donde se emplea cebador de oligonucleótido a base de la secuencia aquí indicada o de partes de ella (por ejemplo puede aislarse una molécula de ácido nucleico que incluye la secuencia total o una parte de ella, mediante reacción de cadena de polimerasa mediante el empleo de un cebador de oligonucleótido, el cual había sido construido a base de esta misma secuencia). Por ejemplo se aísla mRNA de células (por ejemplo mediante sus métodos de extracción de guanidiniotiocianato de Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294 - 5299) y se obtiene de él cARN por medio de transcriptasa reversa (por ejemplo transcriptasa reversa Moloney-MLV, obtenible de Gibco/BRL, Bethesda, MD o transcriptasa reversa AMV, obtenible de Seikagaku Amerika, Inc., St. Petersburg, FL). Se obtienen cebadores sintéticos de oligonucleótidos para la amplificación por medio de la reacción de cadena de polimerasa, a base de una secuencia representada en la SEQ ID No. 1 o con ayuda de las secuencias de aminoácidos representadas en SEQ ID No. 2. Puede amplificarse un ácido nucleico de acuerdo con la invención empleando cADN o de modo alternativo ADN genómico como matriz y cebadores adecuados de oligonucleótidos por medio de técnicas estándar de amplificación PCR. El ácido nucleico así amplificado puede ser clonado en un vector adecuado y caracterizado por medio de análisis de secuencia de ADN. Pueden producirse oligonucleótidos, que corresponden a una secuencia nucleótido-peroxidasa, mediante métodos estándar de síntesis, por ejemplo con un aparato automático de síntesis de ADN. Se determina entonces la actividad de peroxidasa de las proteínas codificadas por las secuencias de estos ácidos nucleicos, mediante las pruebas de enzimas arriba descritas. Con el método aquí descrito se identifican también plantas, que muestran una resistencia de no huésped, en lo cual se demuestra la presencia de la peroxidasa identificada de acuerdo con la invención.

El concepto "hibridación bajo condiciones estrictas" significa en relación con esta invención de la hibridación es ejecutada *in vitro* bajo condiciones que son lo suficientemente exigentes para garantizar una hibridación específica. Las condiciones exigentes de hibridación *in vitro* son conocidas por los expertos y pueden ser tomadas de la literatura (por ejemplo Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY). El concepto "hibridación específica" se relaciona con la circunstancia de que, bajo condiciones estrictas, una molécula se liga preferencialmente a una determinada secuencia de ácido nucleico, la secuencia objetivo, cuando ésta es parte de una mezcla compleja de, por ejemplo moléculas de ADN o ARN, pero no lo hace a otras secuencias o por lo menos lo hace en forma esencialmente reducida.

Las condiciones estrictas dependen de las circunstancias. Las secuencias largas se hibridan específicamente a elevadas temperaturas. Generalmente las condiciones estrictas son elegidas de modo que la temperatura de hibridación está aproximadamente 5°C bajo el punto de fusión (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica definida y un pH definido. La T_m es la temperatura (a un valor definido de pH, una fuerza iónica definida y una concentración definida de ácido nucleico), en la cual se hibrida el 50% de la molécula complementaria a la secuencia objetivo, hasta dar la secuencia objetivo en el estado de equilibrio. Típicamente las condiciones estrictas son aquellas en las cuales la concentración de sal es de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de iones sodio (o concentración de otra sal) a un pH entre 7,0 y 8,3 y la temperatura es por lo menos 30°C para moléculas cortas (es decir por ejemplo 10 a 50 nucleótidos). Adicionalmente las condiciones estrictas pueden incluir la adición de sustancias como por ejemplo formamida, la cual desestabiliza el híbrido. A una hibridación bajo condiciones estrictas, como se emplean aquí, permanecen hibridadas una a otra usualmente secuencias de nucleótidos, que son mutuamente homólogas en por lo menos 60%. Se eligen preferiblemente las condiciones estrictas de modo que las secuencias, que son mutuamente homólogas en por lo menos aproximadamente 65%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 70% y de modo particular preferiblemente por lo menos aproximadamente 75% o más, usualmente permanecen hibridadas una a otra. Un ejemplo preferido, aunque no limitante, para condiciones estrictas de hibridación son hibridaciones en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguidas de una o varias etapas en el lavado en 0,2 x SSC, 0,1% SDS a 50 a 65°C. La temperatura fluctúa por ejemplo bajo condiciones estándar de hibridación, dependiendo del tipo de ácido nucleico, entre 42°C y 58°C en tampón acuoso con una concentración de 0,1 a 5 x SSC (pH 7,2).

En el caso de que esté presente solvente orgánico en el tampón arriba mencionado, por ejemplo 50% de formamida, bajo condiciones estándar la temperatura está en aproximadamente 42°C. Preferiblemente las condiciones estándar de hibridación para el híbrido ADN son: híbrido de ADN por ejemplo 0,1 x SSC y 20°C a 45°C, preferiblemente 30°C

a 45°C. Preferiblemente las condiciones de hibridación para ADN: híbrido de ARN son por ejemplo 0,1 x SSC y 30°C a 55°C, preferiblemente entre 45°C a 55°C. Las temperaturas de hibridación previamente mencionadas son definidas por ejemplo para un ácido nucleico con una longitud aproximada de 100 pares de bases y un contenido G/C de 50%, en ausencia de formamida. El experto sabe cómo pueden ser determinadas las condiciones requeridas de hibridación, mediante libros de texto como los previamente mencionados o los siguientes libros de texto Current Protocols en Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), Hames y Higgins (Hrsgb.) 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

5
10 En el sentido de la invención, el concepto "identidad de secuencias" define una identidad, por consiguiente los mismos nucleótidos en el mismo orden 5'-3', sobre la secuencia total de la secuencia de ácidos nucleicos indicada en SEQ ID No. 1, de por lo menos 80%, preferiblemente de por lo menos 85%, de modo particular preferiblemente de por lo menos 90% y lo más preferiblemente de por lo menos 95%.

15 Se determina la identidad de secuencia en una sucesión de programas que se basan en diferentes algoritmos. En ello, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman entregar resultados particularmente confiables. Para la comparación de secuencias se empleó el programa PileUp (Feng y Doolittle (1987) J. Mol. Evolution 25: 351-360; Higgins et al. (1989) CABIOS 5: 151 - 153) o el programa Gap y Best Fit (Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443 - 453 y Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482 - 489), los cuales están contenidos en el paquete de software GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA).

20 Los valores de identidad de secuencia indicados arriba en porcentaje fueron determinados con el programa GAP sobre la totalidad del rango de secuencia con los siguientes ajustes: peso de brecha: 50, peso de longitud: 3, coincidencia promedio: 10000 y discordancia promedio: 0,000.

Estos ajustes fueron empleados, en caso de que no se indique de otro modo, como ajustes estándar para la comparación de secuencia.

25 Las secuencias de ácidos nucleicos que se apartan de las secuencias de ácidos nucleicos indicadas en SEQ ID No. 1, puede ser generadas por ejemplo mediante incorporación de una o varias sustituciones de nucleótidos, -adiciones o borrados en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 1, de modo que surgen proteínas en las cuales, respecto a la secuencia indicada en la SEQ ID No. 2, se incorporaron una o varias sustituciones, adiciones o borrados de aminoácidos. Las mutaciones pueden ser incorporadas en una de las secuencias de SEQ ID No. 1 mediante técnicas estándar, como por ejemplo mutagénesis específica del lugar y mutagénesis promovida por PCR. Preferiblemente se producen sustituciones que conservan aminoácidos en uno o varios de los radicales aminoácido no esenciales previamente dichos, por consiguiente en radicales aminoácido que no producen la actividad enzimática de la peroxidasa. En una "sustitución que conserva aminoácidos" se intercambia un radical aminoácido por un radical aminoácido con una cadena lateral similar. En el campo de los expertos se definieron familias de radicales de aminoácidos con cadenas laterales similares. Éstas familias abarcan aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ha sido asparagínico y ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptofano). Con ello, en la peroxidasa empleada de acuerdo con la invención, un radical aminoácido no esencial previamente dicho es intercambiado preferiblemente por otro radical aminoácido de la misma familia de cadena lateral. De modo alternativo, en otras formas de operar pueden incorporarse de modo casual las mutaciones sobre la totalidad o una parte de la secuencia que codifica para la peroxidasa, por ejemplo mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden ser examinados según la actividad de peroxidasa, en lo cual la proteína codificada es expresada de modo recombinante para identificar los mutantes que han conservado la actividad de peroxidasa. Por ejemplo la actividad de la peroxidasa de la proteína puede ser determinada empleando las pruebas aquí descritas.

50 "Transgénico" o bien "recombinante", respecto una secuencia de ácido nucleico, significa una cinta de expresión (= estructura de gen) o un vector que contiene la secuencia de ácido nucleico acorde con la invención o un organismo transformado con las secuencias de ácido nucleico acordes con la invención, cintas de expresión o vectores, todas aquellas construcciones realizadas mediante métodos genéticos en los cuales

a) la secuencia de ácido nucleico acorde con la invención o

b) una secuencia de control genético funcionalmente enlazada con la secuencia de ácido nucleico acorde con la invención, por ejemplo un promotor, un o

c) a) y b)

no se encuentran en entorno genético natural o fue modificado mediante métodos de técnica genética, donde la modificación pueden ser por ejemplo una sustitución, adición, borrado, inversión o inserción de uno o varios radicales de nucleótidos. Alrededor genético natural significa el locus natural genómico cromosomal en el organismo de origen o el presente en una biblioteca genómica. En el caso de una biblioteca genómica, se obtiene preferiblemente por lo menos parcialmente el ambiente genético natural de la secuencia de ácido nucleico. El ambiente flanquea la secuencia de ácido nucleico por lo menos en un lado y tiene una longitud de secuencia de por lo menos 50 bp, preferiblemente por lo menos 500 bp, de modo particular preferiblemente por lo menos 1000 bp, de modo muy particular preferiblemente por lo menos 5000 bp. Una cinta de expresión que se encuentra naturalmente - por ejemplo la combinación que se encuentra de modo natural del promotor natural de la peroxidasa con los correspondientes genes de peroxidasa - es transformada en una modificada hasta una cinta de expresión transgénica, cuando ésta es modificada por métodos sintéticos (artificiales), no naturales como por ejemplo un cambio por mutagénesis. Por ejemplo en US 5,565,350 o WO 00/15815 se describen métodos correspondientes.

Como se enumeró arriba, se entiende por una planta o bien células de plantas transgénicas, que los ácidos nucleicos empleados en el método no se encuentran en su estado natural en el genoma de la planta o bien células de la planta, donde los ácidos nucleicos pueden ser expresados de manera homóloga o heteróloga. Transgénico también significa que los ácidos nucleicos acordes con la invención están concretamente en su sitio natural en el genoma de un organismo, que sin embargo la secuencia fue cambiada respecto a la secuencia natural y/o que las secuencias reguladoras de las secuencias naturales fueron cambiadas. Preferiblemente se entiende por transgénica la expresión de los ácidos nucleicos acordes con la invención en sitios no naturales en el genoma, es decir está presente una expresión homóloga o preferiblemente heteróloga del ácido nucleico.

Para el experto es claro que la secuencia de ácido nucleico empleada para la producción de la planta o bien células de plantas transgénicas, la cual codifica para una peroxidasa, dado el caso tiene que adaptarse al empleo de codón específico del organismo. El empleo de codón se determina en virtud de valoraciones por computador de otros genes conocidos del organismo elegido.

En un método preferido acorde con la invención para la producción de plantas o bien células de planta transgénicas con elevada resistencia a patógenos fúngicos, se transmite una secuencia de ácido nucleico que codifica para una peroxidasa acorde con la invención, a una planta o células de plantas transgénicas. Esta transmisión conduce a una elevación de la expresión o bien de la actividad de la peroxidasa, en comparación con las plantas o bien células de plantas tipo silvestre y correspondiente a una elevación en la resistencia a patógenos fúngicos en las plantas o bien células que plantas transgénicas.

Típicamente, de acuerdo con la invención tal método abarca las siguientes etapas:

a) producción de un vector que incluye las siguientes secuencias de ácido nucleico en orientación 5'-3':

- secuencias reguladoras de un promotor activo en células vegetales,

- una secuencia de ADN enlazada con ellas de modo operativo, la cual codifica para una peroxidasa según la presente invención,

- secuencias reguladoras enlazadas de modo operativo a ella, las cuales pueden servir en las células de las plantas como señales de transcripción, terminación y/o poliadenilación,

b) transmisión del vector de la etapa a) a una célula vegetal e integración en el genoma vegetal; y

c) dado el caso regeneración de plantas intactas de las células vegetales transformadas.

Después de la incorporación en una célula de plantas o bien planta, los ácidos nucleicos empleados en el método pueden residir sobre un plásmido separado o ventajosamente está integrados en el genoma de la célula huésped. En la integración en el genoma, ésta puede ocurrir de modo casual o puede ocurrir mediante tal recombinación que el gen nativo es reemplazado por la copia incorporada, con lo que se modula la expresión de la peroxidasa por la célula, o mediante el empleo de un gen en trans, de modo que el gen está unido funcionalmente con una unidad funcional de expresión, la cual contiene por lo menos una secuencia que garantiza la expresión de un gen y por lo menos una secuencia que garantiza la poliadenilación de un gen que transcribe funcionalmente.

De acuerdo con la invención se entiende por elevación de la expresión de gen de un ácido nucleico que codifica para una peroxidasa, también la manipulación de la expresión de la peroxidasa endógena propia de la planta. Esto puede alcanzarse por ejemplo mediante el cambio de la secuencia ADN para el gen que codifica la peroxidasa. Tal cambio, el cual tiene como consecuencia una tasa de expresión modificada, preferiblemente elevada, del gen de peroxidasa endógena, puede ocurrir mediante borrado o inserción de las secuencias de ADN. Un cambio de la

secuencia de promotor de genes de peroxidasa endógena conduce por regla general a un cambio en la cantidad expresada del gen de peroxidasa y con ello también a un cambio perceptible en la actividad de peroxidasa en la célula o bien en las plantas.

5 En los factores de transcripción que están incluidos en la transcripción del gen de peroxidasa endógena reside otra posibilidad para la elevación de la actividad y el contenido de la peroxidasa endógena, es decir sobreregular mediante sobreexpresión. Los expertos conocen la medida de la sobreexpresión de factores de transcripción y así mismo son manifestados para peroxidases en el marco de la presente invención.

10 Además puede alcanzarse una elevada expresión de un gen de peroxidasa endógena, mediante ocurrencia de una interacción de una proteína reguladora, que no ocurre en un organismo no transformado, con el promotor de este gen. Tal regulador puede representar una proteína quimérica la cual consiste en un dominio de enlace ADN y un dominio de activador de transcripción, como se describe por ejemplo en WO 96/06166.

15 La molécula de ácido nucleico recombinante que se emplea para la expresión de peroxidasa incluye, aparte de la secuencia de ácido nucleico de transferencia para la peroxidasa, otros elementos reguladores. Cuáles elementos reguladores concretos tienen que contener estos vectores, depende en ello en cada caso del método en el cual deban emplearse estos vectores. De cuáles elementos reguladores y también otros elementos tienen que disponer estos vectores, es sabido por los expertos, quienes confían en los diferentes métodos arriba mencionados para la producción de plantas transgénicas, en las cuales la expresión de una proteína se ha elevado.

20 Típicamente, los elementos reguladores que están presentes en los vectores son aquellos en los cuales se garantiza la transcripción y en caso de desearse, la traducción en las células vegetales. Por ejemplo, esto puede significar, dependiendo de la planta elegida, que el gen no se expresa y/o se sobreexpresa hasta después de la inducción o que él es expresado y/o sobreexpresado inmediatamente. Por ejemplo, estas secuencias reguladoras son secuencias a las cuales se enlazan los inductores o represores y de este modo regulan la expresión del ácido nucleico. Adicionalmente a estas nuevas secuencias de regulación o en lugar de estas secuencias puede ya la regulación natural de las secuencias estar presente antes del verdadero gen de estructura y dado el caso puede haber sido cambiado genéticamente, de modo que se elimina la regulación natural y aumenta la expresión del gen. La molécula de ácido nucleico recombinante puede también estar construida de un modo sencillo, es decir no se insertan señales de regulación antes de la secuencia de ácido nucleico y el promotor natural con su regulación no se eliminó. En lugar de eso, la secuencia natural de regulación mutó de modo que no ocurre ya más regulación y/o se eleva la expresión del gen. Estos promotores cambiados pueden ser aplicados para el aumento de la actividad en forma de secuencias parciales también solos antes del gen natural. La estructura del gen puede contener además unida funcionalmente de modo ventajoso también una o varias de las denominadas secuencias "potenciadoras", con el promotor, lo cual hace posible una elevada expresión de la secuencia de ácido nucleico. También en el extremo 3' de las secuencias de ADN pueden insertarse de modo ventajoso secuencias adicionales, como otros elementos reguladores o terminadores.

35 En principio, para el método acorde con la invención es posible emplear todos los promotores naturales con sus secuencias reguladoras. Sin embargo, también es posible y ventajoso emplear promotores sintéticos adicionales o solos.

40 Los promotores pueden ser tanto promotores constitutivos como también promotores inducibles o específicos para el desarrollo o histoides. La elección del promotor como también de otras secuencias reguladoras determinan en ello el patrón de expresión espacial y temporal y con ello la expresión de la peroxidasa en plantas transgénicas.

45 Los promotores constitutivos incluyen por ejemplo el promotor del núcleo del promotor Rsyn7 y otros promotores constitutivos que son descritos en WO 99/43838 y número de patente US 6,072,050; el promotor CaMV 35S (Odell et al. (1985) Nature 313: 810 - 812); el promotor Actina (McElroy et al. (1990) Plant Cell 2:163 -171); el promotor ubiquitina (Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 619 - 632 y Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675 - 689); el promotor de pEMU (Last et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81: 581 - 588); el promotor MAS (Velten et al. (1984) EMBO J. 3: 2723 - 2730); el promotor ALS (US patente 5,659,026) y similares. En el empleo de un promotor constitutivo puede alcanzarse una expresión específica de célula o de tejido también mediante la inhibición de la expresión del gen en las células o bien tejidos en los cuales no sea deseada, por ejemplo mediante manifestación de anticuerpos que se enlazan al producto de gen y con ello inhiben su actividad, o mediante inhibidores adecuados que actúan en estas células.

50 Preferiblemente se expresa el gen de peroxidasa de un promotor inducible y de modo particular preferiblemente de un promotor inducible de patógeno. Tales promotores incluyen las proteínas relacionadas con patógenos (proteínas PR), las cuales son inducidas después de la infección con un patógeno, por ejemplo proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-g de glucanasa, quitinasa, etc.. (ver por ejemplo Redolfi et al. (1983) Neth. J. Plant Pathol. 89: 245 - 254; Uknes et al. (1992) Plant Cell 4: 645 - 656; y Van Loon (1985) Plant Mol. Virol. 4: 111-116).

Son de interés particular también patógenos que son expresados localmente en o cerca del lugar de la infección con patógeno, como por ejemplo las descritas por Marineau et al. (1987) *Plant Mol. Biol.* 9: 335 - 342; Matton et al. (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2: 325 - 331; Somsisch et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2427 - 2430; Somsisch et al. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 2: 93 - 98; Yang (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14972 - 14977; Chen et al. (1996) *Plant J.* 10: 955 - 966; Zhang et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2507 - 2511; Warner et al. (1993) *Plant J.* 3:191 - 201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1: 961 - 968.

Además, para el empleo en el método de la presente invención se prefieren también promotores inducibles por heridas, puesto que frecuentemente los patógenos que entran a través de éstas. Tales promotores inducibles por heridas incluyen los inhibidores de proteinasa (pin II) de patata (Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 425 - 449; Duan et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 494 - 498); *wun1* y *wun2* (patente US Nr. 5,428,148); *win1* y *win2* (Stanford et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215: 200 - 208); *sistemina* (McGurl et al. (1992) *Science* 225: 1570 - 1573); *WIP1* (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 783 - 792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323: 73 - 76); el gen *MPI* (Corderok et al. (1994) *Plant J.* 6 (2): 141- 150); la sintasa *FGAM* (Vaghchhipawala et al. (2004) *Genome* 47 (2): 404 - 413; *prxC2* (Kaothien et al. (2002) *Plant Mol. Biol.* 49 (6): 591- 599); *poxA* (Ito et al. (2000) *Plant Science* 155 (1): 85 - 100); *FAD7* (Nishiuchi et al. (1999) *Plant Physiol.* 121 (4): 1239-1246); *TR2'* (WO 03/093483).

Los promotores regulados químicamente pueden ser empleados para regular la expresión de un gen en una planta mediante el uso de un regulador químico exógeno (ver una revisión en Gatz (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 89-108). Los promotores inducibles químicamente son adecuados en particular, cuando se desea que la expresión del gen ocurra de modo específico en el tiempo. Ejemplos de ello incluyen el promotor *ln2-2* de maíz, el cual es activado mediante benzolsulfonamida, el promotor *GST* de maíz, el cual es inducido por unión electrofílica hidrofóbica, y el promotor *PR-1a* de tabaco, el cual es activado por el ácido salicílico. Otros promotores regulados químicamente incluyen promotores de respuesta a esteroides (ver por ejemplo el promotor inducible por glucocorticoide en Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10421 -10425 y McNellis et al. (1998) *Plant J.* 14 (2): 247 - 257), promotores inducibles por etanol e inducibles por tetraciclina (ver por ejemplo Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227: 229 - 237; US-Patent Nrn. 5,814,618 y 5,789,156).

Los expertos saben que el empleo de promotores inducibles permiten la producción de plantas o bien células de plantas que expresan las secuencias acordes con la invención sólo de modo transitorio. Tal expresión transitoria permite la producción de plantas que muestran solo una resistencia transitoria a los patógenos. Tal resistencia transitoria puede entonces ser deseada cuando amenaza el peligro de una contaminación por patógeno y por eso las plantas tienen que ser resistentes sólo por un determinado periodo de tiempo frente al patógeno. Los expertos conocen otras situaciones en las cuales es deseable una resistencia transitoria. Además los expertos también conocen que pueden lograr también una expresión transitoria y con ello una resistencia transitoria mediante el empleo de vectores no estables que replican en células vegetales, las cuales portan la correspondiente secuencia para la expresión de la peroxidasa.

Además pueden emplearse también promotores específicos de tejido para lograr una elevada expresión de peroxidasa dentro de un determinado tejido vegetal. Son por ejemplo promotores específicos de tejido adecuados aquellos que garantizan la expresión específica en las hojas. A estos pertenecen aquellos que se describen en Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 1 (2): 255 - 265; Kwon et al. (1994) *Plant Physiol* 105: 357-367; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35 (5): 773-778; Gotor et al. (1993) *Plant J.* 3: 509-518; Orozco et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23 (6): 1129-1138; Matsuoka et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (20): 9586-9590; Stockhaus et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. G. USA* 84: 7943 - 7947; Stockhaus et al. (1989) *EMBO J.* 8: 2445 - 2451.

También en particular se prefiere emplear promotores específicos de epidermis, puesto que la epidermis como tejido de cierre de los órganos aéreos de las plantas superiores tiene entre otros la tarea de impedir la intrusión de los patógenos en las plantas. A los promotores específicos adecuados de epidermis pertenecen entre otros los promotores de *CER6-* (*CUT1-*) gen de *Arabidopsis* (Hooker et al. (2002) *Plant Physiol.* 129 (4): 1568 -1580 y Kunst et al. (2000) *Biochem. Soc. Trans.* 28 (6): 651 - 654).

Además se prefieren aquellos promotores que son activos en particular en frutas. En ella se cuenta por ejemplo el promotor de un gen de una poligalacturonasa, por ejemplo de tomate (Nicholass et al. (1995) *Plant Mol. Biol.* 28:423-435), el promotor de una oxidasa ACC, por ejemplo de manzana (Atkinson et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38:449-460) o el promotor *2A11* de tomate (van Haaren et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* 17:615-630).

Así mismo se prefieren promotores específicos de mesófilas como el promotor *rbcs* de arroz o tomate (Kyojuka et al. (1993) *Plant Physiol.* 102 (3): 991-1000), el promotor *PPCZm1* de maíz (Kausch et al. (2001) *Plant Mol Biol.* 45 (1): 1-15), el promotor *CAB2* de *Arabidopsis* (Thain et al. (2002) *Plant Physiol.* 130: 102-110) o el promotor *AldP* de arroz (Kagaya et al. (1995) *Mol Gen Genet.* 248 (6): 668-674).

Además el experto promedio esta en capacidad de aislar otros promotores adecuados por medio de métodos de rutina. De este modo, con ayuda de métodos comunes de biología molecular, el experto puede identificar por

- ejemplo experimentos de hibridación o estudios de enlace de proteína-ADN, por ejemplo otros elementos de ácido nucleico reguladores específicos de epidermis. En ello, por ejemplo en una primera etapa se aísla el tejido deseado del organismo deseado del cual se debería aislar la secuencia regulatoria, y de ahí aislarse el poli(A)⁺-ARN total y aplicar un banco cADN. En una segunda etapa con ayuda de clones cADN, los cuales se basan en moléculas poli(A)⁺-ARN de otro tejido, con ayuda del primer banco por medio de hibridación se identifican todos los clones cuya correspondiente molécula poli(A)⁺-ARN se acumula solamente en el tejido deseado. A continuación, con ayuda de estos cADNs así identificados se aíslan promotores los cuales disponen de elementos regulatorios específicos de tejido. Además, los expertos tienen otros métodos basados en PCR para poner a disposición el aislamiento de promotores adecuados específicos de tejido.
- 10 Los vectores acordes con la invención pueden incluir como elementos reguladores adicionalmente también por ejemplo elementos potenciadores, además pueden contener genes de resistencia, señales de replicación y otros rangos ADN, lo cual hace posible una propagación de los vectores en bacterias como por ejemplo *E. coli*. Los elementos reguladores incluyen también secuencias que provocan una estabilización de los vectores en las células huésped. En particular, tales elementos reguladores incluyen secuencias que hacen posible una integración estable del vector en el genoma huésped de la planta o una aplicación autónoma del vector en las células vegetales. Tales elementos reguladores son conocidos por los expertos.

Las denominadas terminaciones de secuencias son secuencias que aseguran que la transcripción o bien la traducción termina de manera apropiada. Si debieran traducirse en los ácidos nucleicos transferidos, las secuencias de terminación son típicamente codones de parada y las correspondientes secuencias reguladoras; si los ácidos núcleos transferidos debieran ser solamente transcritos, por regla general son secuencias poli(A).

Como se emplea aquí, el concepto "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, que puede transportar a una célula otro ácido nucleico al cual está ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", lo cual representa un lazo circular de doble cuerda de ADN, al cual pueden estar ligados segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, donde segmentos adicionales de ADN pueden estar ligados al genoma viral. Determinados vectores pueden replicarse de modo autónomo en una célula huésped en la cual había sido aplicados (por ejemplo vectores de bacterias con origen de replicación bacteriano). Otros vectores son integrados de modo ventajoso en la incorporación en la célula huésped en el genoma de una célula huésped y con ello se replican junto con el genoma huésped. Además determinados vectores pueden modular la expresión de genes con los cuales ellos están unidos de manera operacional. Estos vectores son definidos aquí como "vectores de expresión". Comúnmente los vectores de expresión, que son adecuados para técnicas de recombinación de ADN, tiene la forma de plásmidos. En la presente descripción pueden emplearse de manera intercambiable "plásmido" y "vector", puesto que el plásmido es la forma más frecuentemente empleada del vector. Sin embargo la invención debe incluir también otras formas de vector de expresión, como vectores virales, los cuales ejercen funciones similares. Además, el concepto "vector" debería incluir también otros vectores que son conocidos por los expertos, como fagos, virus como SV40, CMV, TMV, transposons, elementos IS, fásmidos, fagémidos, cósmidos, ADN lineal o circular.

En un vector recombinante de expresión "unido a este modo operativo" significa que la secuencia de nucleótido de interés es unida a la(s) secuencia(s) de regulación de tal modo que se hace posible la expresión de la secuencia de nucleótido y las dos secuencias se unen una a otra de modo que satisfacen la función previamente atribuida a la secuencia.

40 El concepto "secuencia de regulación" debería incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo señales de poliadenilación). Éstas secuencias de regulación son descritas por ejemplo en Goeddel: Gene Expression Technology: Methods en Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), o en Gruber y Crosby, en: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsgb.: Glick und Thompson, capítulo 7, 89-108. Las secuencias de regulación incluyen aquellas que modulan la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótido en varios tipos de célula huésped, y aquellas que modulan la expresión directa de la secuencia de nucleótidos sólo en determinadas células huésped bajo determinadas condiciones. El experto sabe que la configuración del vector de expresión puede depender de factores como la elección de la célula huésped que va ser transformada, la magnitud deseada de la expresión de la proteína, etc.

Los vectores recombinantes de expresión empleados para la expresión de la peroxidasa pueden ser activos tanto en células procarióticas como también en eucarióticas. Esto es ventajoso puesto que frecuentemente, por conveniencia, las etapas intermedias de construcción del vector son llevadas a cabo en microorganismos. Estos vectores de clonación contienen una señal de replicación para el correspondiente microorganismo y un gen marcador para la selección exitosa de células bacterianas transformadas. Para la expresión en organismos procarióticos los expertos conocen vectores adecuados, a los cuales pertenecen por ejemplo en *E. coli* pLG338, pACYC184, la serie pBR, como por ejemplo pBR322, la serie pUC, como por ejemplo pUC18 o pUC19, la serie M113mp, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, □gt11 o pBdCl, en *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361, en *Bacillus* pUB 110, pC194 o pBD214, en *Corynebacterium* pSA77 o pAJ667.

En otra forma de operar, el vector de expresión representa un vector de expresión de levadura o un vector de expresión de bacilovirus.

5 Los vectores arriba mencionados ofrecen sólo un pequeño vistazo sobre los posibles vectores adecuados. Otros plásmidos son conocidos por los expertos y son descritos por ejemplo en: Cloning Vectors (Hrsg. Pouwels, P.H. et al. Elsevier, Amsterdam, New York-Oxford, 1985). Para otros sistemas adecuados de expresión para células procarióticas y eucarióticas ver en los capítulos 15 y 16 de Sambrook y Russell, vide supra.

10 En otra forma de operar del método, la peroxidasa puede ser expresada en células vegetales monocelulares (como algas), ver Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251 y las indicaciones de literatura allí citadas, y células vegetales de plantas mayores (por ejemplo espermatofitas, como Feldfrüchten). Los ejemplos para vectores de expresión de plantas incluyen aquellos que son descritos de manera extensa en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., y Masterson, R. (1992), Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; y Bevan, M.W. (1984), Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer en Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

15 Puesto que muy frecuentemente la expresión de genes de plantas no se limita a los planos de transcripción, una cinta de expresión de plantas contiene, adicionalmente a los elementos arriba descritos, preferiblemente otras secuencias funcionales unidas como potenciadores de traducción, por ejemplo la secuencia Overdrive, la cual contiene la secuencia líder no traducida en 5' del virus de mosaico de tabaco, el cual aumenta la relación proteína /ARN (Gallie et al. (1987) Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

20 El gen que va a ser expresado tiene que, como se describe arriba, estar unido funcionalmente con un promotor adecuado, el cual modula la expresión del gen de modo temporal, específico para la célula o el tejido. Los promotores adecuados fueron ya descritos arriba.

25 Otras secuencias preferidas para el empleo para la unión funcional en cintas de expresión de gen son las secuencias de objetivo, las cuales son necesarias para la modulación de producto de gen en el correspondiente compartimiento celular (ver una revisión en Kermodé (1996) Crit. Rev. Plant Sci. 15 (4): 285-423 y pasajes de literatura allí citados), por ejemplo en la vacuola, el núcleo celular, todos los tipos de plástidos, como amiloplastos, cloroplastos, cromoplastos, el espacio extracelular, las mitocondrias, el retículo endoplasmático, cuerpos aceitosos, peroxisomas y otros compartimientos de las células vegetales.

30 Para la incorporación de las secuencias de peroxidasa en los vectores de expresión, se someten de manera conocida estos de modo ventajoso a una amplificación y ligado. Preferiblemente se procede siguiendo el protocolo de la Pfu-ADN-polimerasa o una mezcla de Pfu/Taq-ADN-polimerasa. El cebador es elegido siguiendo la secuencia que va a ser amplificada. De modo conveniente, el cebador debería ser elegido de modo que el amplificado incluye la secuencia total codógena desde el codón de inicio hasta el codón de parada. A continuación de la amplificación se analiza de modo conveniente el amplificado. Por ejemplo, el análisis puede ocurrir mediante separación electroforética de gel en términos de calidad y cantidad. A continuación puede purificarse el amplificado según protocolo estándar (por ejemplo Qiagen). Entonces, una alícuota del amplificado purificado esta disponible para la siguiente clonación.

40 En general, los expertos conocen vectores adecuados de clonación. A ellos pertenecen en particular vectores que pueden ser replicados en sistemas microbianos, por consiguiente sobre todo vectores que garantizan una eficiente clonación en bacterias, levaduras u hongos y las cuales hacen posible la transformación estable de plantas. Son de mencionar en particular diferentes sistemas de vectores adecuados, binarios y co-integrados para la transformación promovida por el T-ADN. Por regla general tales sistemas de vectores se caracterizan porque ellos comprenden por lo menos los genes vir requeridos para la transformación promovida por agrobacterias así como las secuencias limitadas por T-ADN (frontera T-ADN). Estos sistemas de vectores incluyen preferiblemente también otras regiones reguladoras cis, como promotores y exterminadores y/o marcadores de selección, con las cuales pueden identificarse los correspondientes organismos transformados. Mientras en sistemas de vectores co-integrados los genes vir y las secuencias T-ADN están dispuestos en el mismo vector, en los sistemas binarios basados en al menos dos vectores sin embargo uno de ellos porta un gen vir pero ningún T-ADN y un segundo porta T-ADN y no porta ningún gen vir. Mediante ello los últimos vectores son relativamente pequeños, fáciles de manipular y se pueden rectificar tanto en *E. coli* como también en *Agrobacterium*. A estos vectores binarios pertenecen vectores de las series pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. De acuerdo con la invención se emplean preferiblemente Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV y pCAMBIA. Hellens et al. (2000) Trends en Plant Science 5, 446-451 da un vistazo a los vectores binarios y su empleo.

55 Para la preparación del vector, los vectores pueden ser primero transformados en lineales con endonucleasa(s) de restricción y después modificados enzimáticamente de forma adecuada. A continuación se purifica el vector y se añade una alícuota a la clonación. En la clonación se enlazan mediante una ligasa el amplificado cortado enzimáticamente y dado el caso purificado, con fragmentos de vector preparado de modo similar. En ello, una

determinada estructura de ácido nucleico o bien estructura de vector o de plásmido exhiben uno o también varios cortes codógenos de gen. Preferiblemente, en esas estructuras estos cortes codógenos de gen están enlazados de modo funcional con secuencias reguladoras. A las secuencias reguladoras pertenecen en particular secuencias vegetales como los promotores y terminadores arriba descritos. Los fragmentos se cultivan ventajosamente en un medio adecuado en microorganismos, en particular *E. coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, y se propagan de modo estable bajo condiciones de selección. A continuación las células son cosechadas y lisadas y se extrae de ellas el plásmido. Esto hace posible una transferencia del ADN heterólogo de plantas o microorganismos.

Entre los empleos ventajosos de vectores de clonación pueden aplicarse los ácido nucleico usados en el método acorde con la invención, los ácido nucleicos y estructuras de ácidos nucleicos de la invención, en organismos como microorganismos o preferiblemente plantas y ser empleados para la transformación de plantas, como los que son divulgados y citados en: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), capítulos 6/7, p. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: Transgenic Plants, vol. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, en: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung y R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus (1991) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42: 205-225. Con ello, los ácidos nucleicos empleados en el método, los ácidos nucleicos y estructuras de ácidos nucleicos de la invención y/o vectores se emplean para el cambio por tecnología de genes de un amplio espectro de organismos, preferiblemente de plantas.

Para la introducción de ADN en una célula vegetal huésped están a disposición una multiplicidad de técnicas conocidas, donde el experto puede determinar sin dificultad el método adecuado para cada caso. Estas técnicas incluyen la transformación de células vegetales con T-ADN, empleando como agente de transformación *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*, la fusión de protoplastos, la transferencia directa de genes de ADN aislado en protoplastos, la electroevaporación de ADN, la inserción de ADN por medio del método biolístico así como otras posibilidades. En ello puede generarse tanto transformantes estables como también transitorias.

En la inyección y electroevaporación de ADN en células vegetales, per se no se establecen especiales requerimientos para los plásmidos empleados. Esto aplica de modo similar para la referencia directa de genes. Pueden emplearse plásmidos sencillos como por ejemplo derivados de pUC. Si de las células transformadas de este modo debieran regenerarse plantas completas, sería necesaria la presencia de un gen de marcador seleccionable. Los marcadores de selección corrientes son conocidos por los expertos y no representa para ellos ningún problema seleccionar un marcador adecuado. Son marcadores de selección convencionales aquellos que facilitan la resistencia de células vegetales transformadas respecto a un biocida o un antibiótico como canamicina, G418, bleomicina, higromicina, metotrexato, glifosato, estreptomycin, sulfonil-urea, gentamicina o fosfotricina y similares. El marcador elegido individualmente debería permitir la selección de células transformadas respecto a células en las cuales el ADN introducido está ausente. Para esto son adecuados también marcadores alternativos, como marcadores nutritivos o marcadores de tamizaje (como GFP, proteína fluorescente verde). Evidentemente puede obviarse por completo el marcador de selección, lo que no obstante va acompañado por una considerablemente elevada necesidad de tamizaje. En caso de desearse plantas transgénicas libres de marcadores, están a disposición del experto también estrategias que permiten una eliminación subsecuente del gen de marcador, por ejemplo recombinasas específicas de secuencia o cotransformación. Si el ADN introducido está integrado en el genoma de la célula vegetal, entonces por regla general él está allí estable y permanece también en los descendientes de las células originalmente transformadas.

Si para las transformaciones se emplean agrobacterias, el ADN que va a ser introducido tiene que, como ya se enumeró arriba, ser clonado en plásmidos especiales y concretamente en un vector intermediario o uno binario. Los vectores intermediarios, debido a las secuencias que son homólogas a las secuencias en el T-ADN, se integran mediante recombinación homóloga en el plásmido Ti o Ri de las agrobacterias. Éste contiene además la región vir necesaria para la transferencia del T-ADN. Los vectores intermediarios no pueden replicarse en agrobacterias. El vector intermediario de *Agrobacterium tumefaciens* puede ser transferido por medio de un plásmido auxiliar (conjugación). Los vectores binarios pueden replicarse tanto en *E. coli* como también en agrobacterias. Ellos contiene un gen de marcador de selección y un enlazador o polienlazador, los cuales están enmarcados en la región límite izquierda y derecha de T-ADN. Ellos pueden ser transformados directamente en las agrobacterias (Holsters et al. (1978), Molecular and General Genetics 163, 181-187). La agrobacteria que sirve como célula huésped debería contener un plásmido, el cual porta una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia del T-ADN en la célula vegetal. Adicionalmente puede estar presente T-ADN. La agrobacteria transformada de este modo es empleada para la transformación de células vegetales.

El empleo de T-ADN para la transformación de células vegetales es investigado de modo amplio y como ha sido descrito suficientemente en EP 120 515. B

Para la transferencia del ADN a las células vegetales pueden cultivarse de modo adecuado transplantes de plantas con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Del material infectado de plantas (por ejemplo piezas de hojas, segmentos de tallos, raíces, pero también protoplastos o células vegetales cultivadas en suspensión)

- 5 pueden entonces regenerarse nuevamente plantas completas en un medio adecuado, el cual contiene antibióticos o biocidas para la selección de células transformadas. La regeneración de las plantas ocurre según métodos comunes de regeneración empleando medios nutritivos conocidos. Puede investigarse también la presencia del ADN introducido en las plantas o bien células de plantas obtenidas de este modo, con métodos establecidos por ejemplo Southern Blot o PCR.
- Los expertos conocen otras posibilidades para la introducción de ADN extraño empleando el método biolítico o mediante la transformación de protoplastos (ver L. Willmitzer (1993) *Transgenic Plants in: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise* (editor: H.J. Rehm et al.), volumen 2, 627-659, VCH Weinheim, Alemania).
- 10 Entretanto, no sólo está bien establecida la transformación de plantas dicotiledóneas o bien sus células por sistemas de vectores de plásmido Ti con ayuda de *Agrobacterium tumefaciens*, sino también la de las plantas monocotiledóneas o bien sus células (ver entre otros Chan et al. (1993), *Plant Mol. Biol.* 22, 491-506).
- 15 Son sistemas alternativos para la transformación de plantas monocotiledóneas o bien de sus células la transformación por medio de cargas biolísticas (Wan y Lemaux (1994) *Plant Physiol.* 104, 37-48; Vasil et al. (1993) *Bio/Technology* 11, 1553-1558; Ritala et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 24, 317-325; Spencer et al. (1990), *Theor. Appl. Genet.* 79, 625-631), la transformación por protoplastos, la electroevaporación de células transformadas parcialmente en permeables así como la inserción de ADN por medio de fibras de vidrio.
- 20 Las células transformadas crecen dentro de la planta del modo común (ver también McCormick et al. (1986), *Plant Cell Reports* 5, 81-84). Las plantas resultantes pueden ser cultivadas normalmente y pueden ser cruzadas con plantas que exhiben el mismo factor hereditario transformado u otro factor hereditario. Los individuos híbridos que surgen de allí poseen las correspondientes propiedades fenotípicas.
- Deberían cultivarse dos o más generaciones para tener seguridad de que el rasgo fenotípico se mantiene estable y es heredado. También deberían cosecharse semillas para tener seguridad de que el correspondiente fenotipo u otra peculiaridad se mantengan como se obtuvieron.
- 25 Así mismo, según métodos comunes, pueden identificarse líneas transgénicas que son homocigotas para las nuevas moléculas de ácido nucleico y puede investigarse su comportamiento fenotípico respecto a una capacidad, presente o no presente, para responder a los patógenos y pueden ser comparadas con las líneas hemocigotas. Evidentemente, las células vegetales, las cuales contienen las moléculas de ácido nucleico acorde con la invención, pueden ser cultivadas nuevamente también en forma de un cultivo celular (incluyendo protoplastos, callo, cultivos en suspensión y similares).
- 30 El método acorde con la invención puede ser combinado ventajosamente con otros métodos que provocan una resistencia a los patógenos (por ejemplo contra insectos, hongos, bacterias, nemátodos, etc.), resistencia a la tensión o provocan otro mejoramiento de las propiedades de las plantas. Entre otros se mencionan ejemplos en Dunwell JM (2000) *J Exp Bot.* 51: 487-496.
- 35 El concepto de plantas transgénicas incluyen tanto las plantas en su totalidad como también todas las partes de las mismas, en las cuales la expresión de proteínas vegetales de peroxidasa es elevada. A ellas pertenecen todas las partes de las plantas y órganos de las plantas como hojas, tallo, semillas, raíces, bulbos, anteras, fibras, cabellos de la raíz, pedúnculo, embrión, callos, cotiledones, peciolos, material de cosecha, tejidos vegetales, tejidos reproductivos, cultivos celulares que se derivan de las plantas transgénicas y/o pueden ser empleados para producir las plantas transgénicas.
- 40 Dependiendo del sistema de vector empleado, de acuerdo con la invención pueden producirse también plantas transgénicas en las cuales los ácidos nucleicos que van a ser transferidos a la célula de plantas o bien a las plantas, están presentes como sistemas replicadores autónomos. Los vectores empleados para la transferencia a las plantas tienen entonces que disponer de modo correspondiente de secuencias de ADN que hagan posible la replicación de plásmidos empleados para la transferencia dentro de las células.
- 45 La expresión específica de la proteína de peroxidasa en las plantas acordes con la invención o bien en las células de plantas acordes con la invención pueden ser evidenciada y seguida con ayuda de métodos bioquímicos y de biología molecular convencionales. Estas técnicas son conocidas por los expertos y ellos están en capacidad de elegir sin dificultad un método adecuado de verificación, por ejemplo un análisis de Northern-Blot para comprobar ARN específico de peroxidasa o bien para determinar la altura de la acumulación del ARN específico de peroxidasa o un análisis Southern-Blot o bien de PCR para comprobación de secuencias de ADN que codifican para peroxidasa. Las secuencias de sondas o bien de cebador empleadas para ello pueden ser idénticas a la secuencia indicada en SEQ ID No. 1 o pueden exhibir una pequeña desviación de esta secuencia.
- 50

Las técnicas descritas arriba pueden evidentemente ser empleadas también para identificar otras plantas, las cuales debido a la disponibilidad de la peroxidasa identificada en el marco de la presente invención exhiben una resistencia de no huésped.

- 5 Las plantas empleadas para el método acorde con la invención pueden en principio ser cualquier planta que debiera ser convertida en resistente contra el ataque de patógenos. Preferiblemente es una planta monocotiledónea o dicotiledónea, planta útil, planta alimenticia o planta forrajera.

Son ejemplos de plantas monocotiledóneas aquellos que pertenecen a los géneros Avena (avena), Triticum (trigo), Secale (centeno), Hordeum (cebada), Oryza (arroz), Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum (mijo), Zea (maíz) y similares.

- 10 Las plantas dicotiledóneas útiles incluyen entre otros algodón, leguminosas como frutos de vaina y en particular alfalfa, granos de soya, colza, canola, tomate, remolacha azucarera, patata, girasol, plantas así como árboles ornamentales. Otras plantas útiles pueden incluir frutas (en particular manzana, peras, cerezas, uvas, cítricos, piña y banano), palma de aceite, arbustos de té, cacao y café, tabaco, sisal así como en plantas medicinales Rauwolfia y Digitalis. Se prefieren particularmente los cereales trigo, centeno, avena, cebada, arroz, maíz y mijo, así como las plantas dicotiledóneas remolacha azucarera, colza, soya, tomate, patata y tabaco. Pueden sacarse otras plantas útiles de la patente US Nr. 6,137,030.

- 20 Son plantas preferidas tagetes, girasol, arabis, tabaco, pimienta roja, soya, tomate, berenjena, paprika, zanahoria, patata, maíz, lechuga y brasicáceas, cereales, alfalfa, avena, cebada, centeno, trigo, triticale, mijo, arroz, alfalfa, lino, algodón, cáñamo, brasicáceas como por ejemplo colza o canola, remolacha azucarera, caña de azúcar, especies de nueces y de vid o cultivos madereros, por ejemplo álamo o tejo.

Las plantas transgénicas acordes con la invención y las células, cultivos celulares, partes y materiales de replicación transgénico derivados de ellas pueden ser empleados para la producción de alimentos y forraje para animales, farmacéuticos o productos químicos purificados.

- 25 La identificación de la peroxidasa de cebada como gen que promueve una resistencia de no huésped de la cebada respecto a aislados de *Blumeria graminis f. sp. triticum* y su aplicación para la promoción de la resistencia de los patógenos en plantas o células de plantas transgénicas es representada ahora en lo que sigue. Los ejemplos siguientes no deberían ser interpretados como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: método general de clonación

- 30 Se ejecutaron los métodos de clonación como por ejemplo escisión de restricción, electroforesis en gel de agarosa, purificación de fragmentos de ADN, transferencia de ácidos nucleico se membranas de nitrocelulosa y nylon, unión de fragmentos de ADN, transformación de células de *E. coli*, propagación de bacterias y el análisis de secuencia de ADN recombinante, como se describe en Sambrook et al. (2001), vide supra.

Ejemplo 2: análisis de secuencia de ADN recombinante:

- 35 La determinación de la secuencia de la molécula de recombinante ocurrió con un secuenciador de ADN de fluorescencia por láser de la compañía ABI según el método de Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467).

Ejemplo 3: identificación de HvBgt1 de cebada mediante huella de oligonucleótidos

- 40 El gen de peroxidasa HvBgt1 de cebada fue identificado mediante análisis de huella de oligonucleótidos (Radelof et al. (1998) Nucleic Acids Res. 26(23):5358-64) como gen inducido por Bgt. Este método permite la identificación de patrones de expresión también de genes con muy baja expresión.

- 45 Se identificó HvBgt1 en una biblioteca, que fue generada de mRNA de plantas de cebada que habían sido infectadas con oídio de trigo (Bgt; puntos de cosecha en el tiempo de los tejidos de hoja: 6, 24, 48 y 72 h.p.i.). Empleando el software HyStac desarrollado por BASF Corporation se comparó la abundancia la aglomeración individual en esta biblioteca con las otras dos bibliotecas de cebada (cebada inoculada con oídio de cebada (Bgh) así como cebada no inoculada), las cuales sirvieron como referencia. En este análisis para HvBgt1 resultó el pronóstico de una abundancia aumentada en aproximadamente 10 veces en la biblioteca de cebada + Bgt.

Ejemplo 4: cultivo de líneas de cebada e infección con oídio

Para los experimentos se empleó la línea silvestre de cebada Ingrid MLOBc. Las semillas fueron suministradas por Dr. Patrick Schweizer, IPK Gatersleben.

Después de la siembra en tierra, las semillas fueron incubadas para estratificación por 24 h a 4°C. Después se colocaron las plantas bajo condiciones controladas de crecimiento en el invernadero (Agrarzentrum Limburgerhof, BASF AG). La temperatura en promedio fue de 23°C, la humedad del aire estuvo entre 40 y 70%. La cadencia día/noche fue 10h y 14 h. Siete días después de la siembra las semillas fueron inoculadas con Bgh o Bgt. El aislado FA6h del patógeno *Blumeria graminis f. sp. hordei* empleado para la investigación fue suministrado por la estación de investigación de ETH Zürich en Heckenholz. El patógeno *Blumeria graminis f. sp. tritici* es un aislado de campo que es cultivado en el Agrarzentrum de BASF AG en el tipo canciller de trigo. Para la infección se sacudieron fuertemente plantas de cebada infectadas con Bgh o bien de trigo infectadas con Bgt sobre las plantas de cebada o bien de **Arabidopsis** que se mantenían para ser infectadas, y el oídio, para transferir las conidias sobre las plantas.

Ejemplo 5: aislamiento del ARN total de plantas de cebada infectadas

En un periodo de tiempo de varios días se cosechó en cada caso después de 24 horas material infectado de cebada y controles no infectados, se empacaron en láminas de aluminio y se congelaron en hielo seco. El almacenamiento del material de hoja ocurrió a -80°C. Después de desmenuzar el material de las hojas se aisló el ARN total con ayuda de RNeasy Plant Maxi Kit® (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo a las indicaciones del productor. La elución del ARN purificado ocurrió con 2 x 0,6 ml de agua libre de RNasa. La concentración fue determinada con el BioPhotometer EPPENDORF 6131, a continuación se precipitó el ARN con 2 partes en volumen de etanol al 98% y 1/10 parte en volumen de acetato de sodio (3 M, pH 5,2) y se ajustó una concentración de aproximadamente 2 µg/µl.

Ejemplo 6: determinación de la expresión de peroxidasa mediante análisis cuantitativo de PCR

Para el PCR cuantitativo se emplearon las muestras de ARN aisladas del material de hojas. Primero que todo se hizo digestión, en caso de ser necesario, del ADN presente en las muestras de ARN. Se añadió ADN-free™ de la compañía AMBION (Huntingdon, USA) al producto de la digestión, como sigue:

25	ARN	50 µl
	10x ADNse I Puffer	6 µl
	ADNasa I (2 U/ml)	2 µl
	H2O ad 60 ml	2µl

Se incubó esta carga por 30 min a 37°C. A continuación se añadieron 9 ml de reactivo de inactivación ADNasa y se mezcló bien la carga. Después de un tiempo adicional de incubación de 2 min a temperatura ambiente se centrifugó la solución a 10000 g por 1 min, para transformar el reactivo de inactivación ADNasa en pellas. Se trasladó el ARN a un nuevo recipiente y se almacenó a -20°C.

Después de la digestión de ADNasa se hizo transición reversa del ARN en cADN. La transformación ocurrió con el reactivo de transición reversa Taq Man de la compañía APPLIED BIOSYSTEMS (Applera Deutschland GmbH, Darmstadt):

35	ARN	6 µl
	25 mM MgCl ₂	4,4 µl
	dNTP-Mix (10 mM)	4 µl
	Hexámero aleatorio 50 mM	1 µl
	Tampón 11x RT	2 µl
40	Inhibidor de RNasa	0,4 µl
	Multiscribe RT (50 U/ml)	1,5 µl
	H ₂ O libre de nucleasa	0,7 µl

ES 2 371 477 T3

Se incubó la carga por 10 min a 25°C, a continuación ocurrió una incubación a 37°C por 60 min. Finalmente se inactivo con calor la carga por 5 min a 95°C.

5 El ADN transcrito fue diluido con 20 µl de H₂O y se añadieron de allí en cada caso 2,5 µl para el PCR cuantitativo. Como estándar interno se usó el 18S rARN. De todas las muestras se realizó la determinación tres veces. Las muestras fueron transferidas con pipeta a una placa 96 Napf. Primero se añadió individualmente el cADN, después se añadió al SYBR Green® Master Mix individualmente con pipeta el cebador y la correspondiente cantidad de agua y se mezcló la carga.

	cADN	2,5 µl
	2x SYBR Green® Master Mix	12,5 µl
10	Cebador hacia adelante Gip 162, 200 nM	0,09 µl
	Cebador reverso, Gip 163, 200 nM	0,14 µl
	H ₂ O libre de nucleasa ad 25 µl	9,77 µl

Gip 162: CGAGGCCCTTGTGACATACAT

15 Gip 163: ACTTAGGTGTCGTTACTTGGACCAT

Como muestras de referencia sirvieron los respectivos valores de control antes de la infección (0 h). La determinación de la cantidad transcrita ocurrió con muestras que fueron tomadas 24 h, 48 h y 72 h después de la infección con Bgh.

Carga para el 18S rARN:

	cADN	2,5 µl
	2x SYBR Green® Master Mix	12,5 µl
	Cebador reverso, Gip 64, 200 nM	0,13 µl
	H ₂ O libre de nucleasa	9,75 µl

25 Gip 63: CGTCCCTGCCCTTTGTACAC

Gip 64: AACACTTCACCGGACCATTCA

30 Se centrifugó la placa a temperatura ambiente y 2500 rpm por 1 min, después se midieron las muestras directamente en el aparato ABI PRISM 7000 de la compañía APPLIED BIOSYSTEMS (Applied Deutschland GmbH, Darmstadt). La valoración ocurrió con ayuda del programa ABI PRISM 7000 SDS de la compañía APPLIED BIOSYSTEMS.

Los datos de expresión determinados con el PCR cuantitativo son representados en la tabla 5 e ilustración 1. La medición fue ejecutada dos veces y se tomó tres veces la determinación del valor individual de medida. Se muestra en cada caso el valor promedio y la desviación estándar correspondiente.

Tabla 5: representación del curso en el tiempo de la expresión de HvBgt1 en la interacción no huésped (Cebada y Bgt) y la interacción huésped (Cebada con Bgh)

Número de muestra	Material vegetal	Expresión del gen	Desviación estándar	Calibrador
1	Ingrid Cont. 0h	1,0	0,1	Ingrid 0 h Control
2	Ingrid Cont. 24 h	6,1	3,5	
3	Ingrid Cont. 48 h	28,2	4,9	
4	Ingrid Cont. 72 h	25,1	3,4	
5	Ingrid + Bgt 0 hpi	1,0	0,3	Ingrid + Bgt 0 hpi
6	Ingrid + Bgt 24 hpi	107,1	18,3	
7	Ingrid + Bgt 48 hpi	25,0	12,9	
8	Ingrid + Bgt 72 hpi	10,6	5,0	
9	Ingrid + Bgh 0 hpi	1,0	0,1	Ingrid + Bgh 0 hpi
10	Ingrid + Bgh 24 hpi	1,5	0,6	
11	Ingrid + Bgh 48 hpi	0,5	0,1	
12	Ingrid + Bgh 72 hpi	3,1	1,2	

Como valor de comparación o bien calibrador sirvió para cada interacción del valor 0 h de la medición.

- 5 Los resultados muestran una clara diferencia en la expresión HvBgt1 entre los tres controles de sistema, la interacción-no huésped y la interacción-huésped. En los controles se registra hasta un punto del tiempo de 48 h una clara elevación de la cantidad de transcripción de hasta 28 veces, la cual después a 72 h después del comienzo de la medición permanece casi constante. Por el contrario, en la interacción-no huésped (cebada-Bgt) se reconoce hasta después de 24 h una elevación de casi 110 veces, la cual después de 72 h se reduce nuevamente en forma
- 10 lenta a una cantidad de 10 veces. En contraste en la interacción-huésped (cebada-Bgh) sobre el transcurso total se reconoce sólo una elevación máxima de tres veces de la cantidad de transcripción.

Ejemplo 7: aislamiento de la totalidad de la longitud de la secuencia de HvBgt1 de cebada mediante RACE-PCR

- 15 Para el RACE-PCR se empleó el ARN aislado del material infectado de hojas. Se produjo el banco RACE-cADN con el equipamiento GeneRacer™ de la compañía Invitrogen (Karlsruhe, Alemania) según indicaciones del productor. Se empleó como cebador específico de gen (GSP) como cebador 5'-RACE el cebador M207 y como cebador anidado de cebador M208.

M207: GCTTATTCAGCAGCCAACAAAGTAAC

M208: CTGTTTCACAAGTTTATGGTCCAAGTAA

- 20 Carga de las muestras PCR:

Tampón 10x de polimerasa 5 µl

dNTP-Mix (10 mM), INVITROGEN 1,5 µl

Template (banco Hv-RACE) 1 µl

ES 2 371 477 T3

	GSP, M 207 (10 pmol)	4 µl
	GeneRacer X'Primer (10 pmol)	4,5 µl
	Polimerasa (5 U/µl)	1 µl
5	H ₂ O	33 µl

Programa PCR

	Desnaturalización	95 °C	2 min	
10	Desnaturalización	95 °C	30 seg	} 25 x
	Fijación (recocido)	65 °C	30 seg	
	Polimerización	68 °C	2 min	
	Polimerización final	68 °C	10 min	

Carga para las muestras anidadas PCR:

15	Tampón 10x de polimerasa	5 µl
	dNTP-Mix (10 mM), INVITROGEN	1,5 µl
	Template (carga PCR)	5 µl
	GSP, M 207 (10 pmol)	4 µl
	Cebador anidado GeneRacer X', M 208 (10 pmol)	4,5 µl
20	Polimerasa (5 U/µl)	1 µl
	H ₂ O	33 µl

Programa PCR

	Desnaturalización	95 °C	2 min	
25	Desnaturalización	95 °C	30 seg	} 25 x
	Fijación (recocido)	65 °C	30 seg	
	Polimerización	68 °C	2 min	
	Polimerización final	68 °C	10 min	

30 Se amplificó la secuencia de longitud total del gen HvBgt1 en varias etapas parciales, a continuación se determinó la secuencia y después se combinó *in silico*. Después de que se amplificó una pieza de secuencia con extensión poli-A mediante el 3'RACE y otra pieza de secuencia con el 5'-RACE se pudieron unir en un *contig* las nuevas secuencias

5 con las secuencias originales. La secuencia total era de aproximadamente 1000 bp. Con ayuda del programa de computador ContigExpress (INFORMAX, Maryland, USA) se desplegaron todos los ORFs, que son posibles en la secuencia. Pudo encontrarse un ORF que se extiende sobre longitud de 945 bp. Para comprobar si el gen es completo se buscó otro codón de parada antes del inicio. Pudo encontrarse el codón de parada después de 3 tripletes en dirección 5'.

Para obtener el gen como clon de longitud total se eligió un cebador que permite la amplificación de la totalidad del gen (PCR fin a fin). Se purificó entonces fragmento PCR del gel de agarosa y se clonó en el vector pCR®4-TOPO®. La secuencia de nucleótidos de longitud total de HvBgt1 está representada en SEQ ID No. 1 y la secuencia de aminoácidos está representada en SEQ ID No. 2.

10 **Ejemplo 8: identificación y clonación del gen homólogo a HvBgt1 en *Arabidopsis thaliana***

Después de que se obtuvo la secuencia de longitud total de la peroxidasa de cebada (HvBgt1), se ejecutó con esta secuencia una búsqueda BLAST respecto al genoma de Arabidopsis. En ello se identificaron dos genes homólogos, AtBgt1-1 y AtBgt1-2. Éstos dos genes fueron amplificados mediante PCR con cebadores adecuados de *A. thaliana*-cADN y fueron clonados con promotor constitutivo en el vector de expresión vegetal pCambia, para hacer posible una sobreexpresión en *A. thaliana*.

Primero se localizó el ARN total de una mezcla de plantas de Arabidopsis no infectadas y plantas de Arabidopsis que había sido infectadas con *Alternaria alternata* y *Alternaria brassicola*, empleando el Superscript First Strand Synthesis System para RT-PCR® (INVITROGEN, Karlsruhe), en cADN.

20 Para la amplificación de la secuencia de la longitud total del gen de cADN mediante PCR con Platinum Pfx-polimerasa (INVITROGEN, Karlsruhe, Alemania) se derivaron cebadores a base de las secuencias AtBgt1-1 o bien AtBgt1-2. El tamaño de fragmento que va a ser amplificado para AtBgt1-2 debería ser de 1015 bp. La amplificación de la secuencia AtBgt1-2 ocurrió con los dos cebadores Fra335 y Fra336 según el protocolo:

	Tampón de polimerasa 10x, STRATAGENE (La Jolla, EEUU)	5 µl
	dNTP-Mix (10 mM), INVITROGEN(Karlsruhe, Alemania)	1 µl
25	cADN	1 µl
	Fra335 (20 pmol)	1 µl
	Fra336 (20 pmol)	1 µl
	Polimerasa Taq (5 U/µl)	1 µl
	H ₂ O	40 µl

30

Fra 335: AGAAGTATGTTAAAGGTGGTGTGTTG

Fra 336: TGACGAAGAGGTGATTATTGAGC

Programa PCR

35	Desnaturalización	95 °C	5 min	
	Desnaturalización	95 °C	30 seg	} 35 x
	Fijación (recocido)	55,9 °C	30 seg	
	Polimerización	72 °C	2 min	
	Polimerización final	72 °C	10 min	

Después de la purificación de los fragmentos PCR del gel se hizo clonación intermedia de las secuencias en el vector pCR@Blunt-II-TOPO® (INVITROGEN, Karlsruhe) y se transformaron en células *E.coli* TOP10®. Mediante selección azul-blanco se eligieron colonias que contenían el fragmento. Con estas colonias se inocularon minicultivos para aislar el plásmido-ADN. Para cada fragmento se hizo la secuencia de tres clones (ADN-Labor, BASF AG, Ludwigshafen). Los clones mostraron una coincidencia de secuencias de 100% y fueron cortados con EcoRI del vector de TOPO® y separados por electroforesis en gel. Los fragmentos fueron purificados del gel y ligados al vector pCambia, que había sido cortado con EcoRI.

Ejemplo 9: transformación transitoria de células de cebada, sobreexpresión y evaluación del desarrollo de patógenos fúngicos

Se transformaron segmentos de hoja de cebada cv Pallas con el HvBgt1-ADN junto con un vector de expresión GFP. A continuación se inocularon las hojas con Bgh y se analizó el resultado después de 48 h por medio de microscopía de luz y de fluorescencia. Se evaluó la penetración de células que expresan GFP por medio de la detección de haustorias en células vivas y mediante la estimación del desarrollo de hongos en estas células. En todos los seis experimentos, el bombardeo de cebada cv Pallas con HvBgt1 condujo a un número reducido de células penetradas exitosamente por Bgh en comparación con las células que había sido bombardeadas con un control ADN extraño (receptor humano de hormona tiroidea, TR).

Para la transformación transitoria de células de cebada se empleó un método que ya fue descrito para la introducción biolística de ADN en células epidérmicas de hojas de cebada (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54). Se recubrieron partículas de tungsteno con un diámetro de 1,1 µm (densidad de partícula 25 mg/ml) con HvBgt1-ADN junto con plásmido-ADN del vector pGFP (GFP bajo control del promotor pUBI), como marcadores de transformación. Para ello, para el revestimiento se emplearon por disparo las siguientes cantidades de ADN o bien de plásmido de reporte: 1 µg pGFP y 2 µg ADN.

Para la preparación del microvehículo se lavaron 55 mg de partículas de tungsteno (M 17, diámetro 1,1 µm; Bio-Rad, Munich) dos veces con 1 ml de agua destilada sometida a autoclave y una vez con 1 mL de alcohol absoluto, se secaron y se tomaron en 1 ml de glicerina al 50 % (solución madre de aproximadamente 50 mg/ml). Se diluyó la solución con glicerina al 50 % hasta 25 mg/ml, se mezcló bien antes de la aplicación y se suspendió en baño de ultrasonido. Para el revestimiento del microvehículo se añadieron conjuntamente gota a gota por disparo 1 µg de plásmido, 2 µg de HvBgt1-ADN (1 mL), 12,5 µl de suspensión de partículas de tungsteno (25 mg/ml), 12,5 µl de solución 1 M de Ca(NO₃)₂ (pH 10) mezclando constantemente, se dejó por 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó brevemente y se tomaron 20 µl del sobrenadante. Se suspendió nuevamente en el baño de ultrasonido el residuo con las partículas de tungsteno y se empleó en el experimento.

Para la transformación se emplearon segmentos de aproximadamente 4 cm de longitud de hojas primarias de cebada. Se colocaron los tejidos en 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) con 20 µg/ml de bencimidazol en discos de Petri (diámetro de 6,5 cm) y directamente antes del bombardeo con partículas se cubrió en los bordes con una plantilla con una abertura rectangular de 2,2 cm x 2,3 cm. Se colocaron las placas una después de otra en el suelo de una cámara de vacío (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54), en la cual está intercalada una red de nylon (abertura de malla 0,2 mm, Millipore, Eschborn) como difusor sobre una placa perforada (5 cm en el piso, 11 cm bajo el microvehículo, s.u.), para dispersar los cúmulos de partículas y frenar la corriente de las mismas. El microvehículo montado arriba de la cámara (soporte del filtro plástico estéril, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) fue cargado en cada disparo con 5,8 µL de partículas de tungsteno recubiertas con ADN (microvehículo, s.u.). Con una bomba al vacío de membrana (Vacuubrand, Wertheim) se redujo la presión en la cámara a 0,9 bar y se dispararon las partículas de tungsteno con 9 bar de presión del gas helio sobre la superficie del tejido vegetal. Inmediatamente después se ventiló la cámara. Para marcar las células transformadas se bombardearon las hojas con el plásmido pGFP (vector a base de pUC18-Basis, cinta de promotor/terminador CaMV 35S con gen GFP insertado; Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 647-54 puesto a disposición por Dr. P. Schweizer, Institut für Pflanzengenetik (IPK), Gatersleben, Alemania). Antes del disparo con otro plásmido, se limpió en cada caso el microvehículo completamente con agua. Luego de varias horas de incubación después del bombardeo, con las placas de Petri ligeramente abiertas, a temperatura ambiente y luz del día se inocularon las hojas con 100 conidias/mm² de verdadero hongo oídio de cebada (*Blumeria graminis f.sp. hordei*, raza A6) y se incubó por otras 36 a 48 h bajo las mismas condiciones antes de que ocurriera la valoración de evidencias de infección.

El resultado (por ejemplo la eficiencia de penetración definida como la fracción porcentual de células atacadas que muestran una haustoria madura y una hifa secundaria ("hifa de elongación secundaria")), se determinó por medio de microscopía de fluorescencia y de luz. Una inoculación con 100 conidias/mm² arrojó una frecuencia de ataque de aproximadamente 50 % de las células transformadas. Para cada experimento individual se valoraron un número mínimo de 100 sitios de interacción. Las células transformadas (que expresan GFP) fueron identificadas bajo excitación con luz azul. Pudieron diferenciarse tres distintas categorías de células transformadas:

1. Células penetradas que contienen una haustoria fácilmente reconocible. Una célula con más de una haustoria fue valorada como una célula.

5 2. Células que fueron concretamente atacadas por un appressorium de hongo, pero no contiene ninguna haustoria. Una célula que fue atacada varias veces por Bgh, pero que no contuvo ninguna haustoria fue valorada como una célula.

3. Células que no fueron atacadas por Bgh.

10 Se excluyeron de la valoración las células del estoma y células adyacentes al estoma. Se analizaron las estructuras superficiales de Bgh por medio de microscopia de luz o coloración en fluorescencia del hongo con 0,1 % de Calcofluor (p/v en agua) por 30 segundos. Puede evaluarse fácilmente el desarrollo del hongo mediante microscopia de fluorescencia después de tinción con Calcofluor. Las células transformadas en HvBgt1-ADN desarrollan el hongo concretamente en un tubo de germinación primario y uno appressorial ("*Germ-Tube*"), pero ninguna haustoria. La formación de haustoria es una condición previa para la formación de una hifa secundaria.

15 La eficiencia relativa de penetración (RPE) se calcula como el cociente de la eficiencia de penetración en las células que había sido transformadas con HvBgt1 y la eficiencia de penetración en células que había sido transformadas con el ADN de control. Se calculó el RPE porcentual (RPE %) a partir del RPE menos 1 y multiplicado por 100.

$$\text{RPE} = (\text{PE en células transformadas con HvBgt1-ADN}) / (\text{PE en células transformadas con ADN control})$$

$$\text{RPE \%} = 100 * (\text{RPE}-1)$$

El valor RPE % (desviación de la eficiencia promedio de penetración del control) sirve para la determinación de la susceptibilidad de las células que fueron transfectadas con HvBgt1-ADN.

20 En cinco pruebas independientes no se observó ninguna diferencia entre la transfección con el ADN- control y agua, respecto a la eficiencia de penetración de Bgh.

25 Para excluir una influencia del HvBgt1-ADN de la tasa de transformación o tasa de sobrevivencia de las células atacadas, se comparó el número de células que expresaban GFP entre experimentos de ADN- control y HvBgt1-ADN. De modo interesante, la sobreexpresión de HvBgt1 no tiene ninguna influencia sobre el número total o el número de células atacadas que expresan GFP.

Ejemplo 10: transformación de *Arabidopsis thaliana* con HvBgt1 y análisis de la resistencia a los hongos

30 Se transformaron plantas de tipo silvestre de *A. thaliana* (Columbia) con la cepa *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) con base en un método modificado (Steve Clough y Andrew Bent (1998) Plant J 16(6):735- 743) del método de infiltración al vacío según Bechtold et al. (Bechtold N et al. (1993) CR Acad Sci Paris, Life Sciences 316:1194- 1199). Para ello se empleó un vector primario de expresión, el cual es adecuado para la transformación con *A. tumefaciens*, como por ejemplo pCambia.

Se seleccionaron células de transformantes primarios transformadas con *Agrobacterium*, seleccionadas con base en la resistencia a canamicina. Se plantaron en la tierra brotes resistentes a los antibióticos y se emplearon para análisis bioquímicos, plantas totalmente desarrolladas.

35 Para el análisis de la resistencia de plantas transgénicas de *Arabidopsis* respecto a patógenos fúngicos se hicieron inoculaciones de los hongos biotrofos *Peronospora parasitica* y *Erysiphe cichoracearum*.

a) *Peronospora parasitica*

40 Se atomizaron plantas con una edad de 5 a 8 semanas con una suspensión de esporas de conidias (aproximadamente 10^6 esporas/ml). Las plantas inoculadas fueron mantenidas durante la noche a oscuras y húmedas, en un refrigerador a aproximadamente 16°C, cubiertas con una bolsa plástica. Después de un día se abrieron ligeramente las bolsas plásticas y posteriormente se eliminaron completamente. Seis días después de la inoculación se cubrieron nuevamente las plantas durante la noche con la bolsa plástica, con lo que se indujo la esporulación. Al siguiente se examinaron las hojas buscando la aparición de conidióforos. En los siguientes días el crecimiento intercelular del hongo condujo a la inducción de clorosis débil hasta necrosis fuerte en las hojas. Se cuantificaron estos síntomas y se probó su significancia.

b) *Erysiphe cichoracearum*

5 El biotrofo hongo de oídio fue cultivado sobre plantas de Arabidopsis. Para la infección, con un pincel fino se retiraron los portadores de conidias de la superficie de las hojas de las plantas transgénicas de Arabidopsis de cuatro semanas de edad que expresan HvBgt1 y se aplicaron con el pincel sobre las hojas de las plantas transgénicas. Se incubaron las plantas por 7 días a 20°C. Siete días después de la inoculación los portadores de conidias eran visibles sobre las hojas, y se manifestaron clorosis y necrosis en los siguientes días. Se cuantificaron estos síntomas y se probó su significancia.

c) resultados

10 Las plantas transgénicas de Arabidopsis que expresan secuencias en sentido para el HvBgt1 muestra en la mayoría de los casos tanto frente a *Peronospora parasitica* como también frente a *Erysiphe cichoracearum* una resistencia significativamente elevada en comparación con las plantas no transgénicas tipo silvestre.

Las plantas transgénicas de Arabidopsis que expresan secuencias anti sentido para AtBgt1 o HvBgt1, muestran tanto respecto a *Peronospora parasitica* como también respecto a *Erysiphe cichoracearum* una sensibilidad significativamente elevada en comparación con plantas tipo silvestre no transgénicas.

Ilustraciones

15 Ilustración 1: representación del transcurso a lo largo del tiempo de la expresión de HvBgt1 en la interacción de no huésped (cebada (Ingrid) y Bgt) y la interacción de huésped (cebada (Ingrid) con Bgh)

Se representan los datos de expresión relativa mostrados en la tabla 5, con la desviación estándar perteneciente a ellos. Los resultados muestran la elevación de la cantidad de transcripción en la interacción de no huésped a lo largo de la medición.

20 LISTADO DE SECUENCIA

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Método para la elevación de la resistencia a los patógenos en plantas transgénicas mediante la expresión de una peroxidasa

<130> B 7661

25 <160> 12

<170> versión de patente 3.3

<210> 1

<211> 945

<212> ADN

30 <213> Hordeum vulgare

<400> 1

ES 2 371 477 T3

```

atggccteta cttcgtccct atcagtggg ttgctcttgt gcctggccgt ggcggcgctg    60
gcgcagctgt cgcgcagctt ctaccaaacg acgtgcccga acgctctgtc caccatcaag    120
gccgccgtga cggccgccgt gaacaatgag aaccgcatgg gcgcgtcgct gctccggctg    180
cacttccacg actgcttcgt ccaaggttgt gacgcgtctg ttctgctgtc tggcatggaa    240
caaaacggcg cgcggaacgt catgtccctg cgaggettcg aagtcataga cagcatcaag    300
gcgaagctcg agaccatgtg caagcagacc gtctcctgcg ccgacatcct caccgtcgct    360
gcccgcgatt ccgtcgtcgc cttgggaggg ccacgtgga cggttccgct aggaaggagg    420
gactccacca atgcaaacga agcagcggcg aactcagacc tacctcccc gttcttcgac    480
ctcgtcaacc tcacccaatc cttcggcgac aagggttca ccgtcaccga catggtcgcg    540
ctctccggtg cccacaccat cggacaggcg cagtgccaga acttcaggga taggtctac    600
aacgagacta acatcaactc cggcttcgcg acgtcgtcga aggccaactg cccccggccg    660
accggtccg gcgaccgcaa cctggccaat ctggacgtgt ctaccccgta ctcattcgac    720
aacgcctact acagcaacct caagtcccag aaggggctcc tgcactctga ccaggtgctc    780
ttcaccggca cgggcggcgg cacggacaac atcgtcaaca acttcgcgag caaccagct    840
gcgttcagcg gcgcctttgc ctcggccatg gtgaagatgg ggaacctcag cccattgact    900
ggctctcagg ggcaggtcag gctgagctgc tccaaggtga attaa                    945

```

<210> 2

<211> 314

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

```

Met Ala Ser Thr Ser Ser Leu Ser Val Val Leu Leu Leu Cys Leu Ala
1           5           10           15

```

ES 2 371 477 T3

Val Ala Ala Ser Ala Gln Leu Ser Pro Thr Phe Tyr Gln Thr Thr Cys
 20 25 30

Pro Asn Ala Leu Ser Thr Ile Lys Ala Ala Val Thr Ala Ala Val Asn
 35 40 45

Asn Glu Asn Arg Met Gly Ala Ser Leu Leu Arg Leu His Phe His Asp
 50 55 60

Cys Phe Val Gln Gly Cys Asp Ala Ser Val Leu Leu Ser Gly Met Glu
 65 70 75 80

Gln Asn Ala Ala Pro Asn Val Met Ser Leu Arg Gly Phe Glu Val Ile
 85 90 95

Asp Ser Ile Lys Ala Lys Leu Glu Thr Met Cys Lys Gln Thr Val Ser
 100 105 110

Cys Ala Asp Ile Leu Thr Val Ala Ala Arg Asp Ser Val Val Ala Leu
 115 120 125

Gly Gly Pro Ser Trp Thr Val Pro Leu Gly Arg Arg Asp Ser Thr Asn
 130 135 140

Ala Asn Glu Ala Ala Ala Asn Ser Asp Leu Pro Pro Pro Phe Phe Asp
 145 150 155 160

Leu Val Asn Leu Thr Gln Ser Phe Gly Asp Lys Gly Phe Thr Val Thr
 165 170 175

Asp Met Val Ala Leu Ser Gly Ala His Thr Ile Gly Gln Ala Gln Cys
 180 185 190

Gln Asn Phe Arg Asp Arg Leu Tyr Asn Glu Thr Asn Ile Asn Ser Gly
 195 200 205

Phe Ala Thr Ser Leu Lys Ala Asn Cys Pro Arg Pro Thr Gly Ser Gly
 210 215 220

Asp Arg Asn Leu Ala Asn Leu Asp Val Ser Thr Pro Tyr Ser Phe Asp
 225 230 235 240

Asn Ala Tyr Tyr Ser Asn Leu Lys Ser Gln Lys Gly Leu Leu His Ser
 245 250 255

Asp Gln Val Leu Phe Thr Gly Thr Gly Gly Gly Thr Asp Asn Ile Val
 260 265 270

Asn Asn Phe Ala Ser Asn Pro Ala Ala Phe Ser Gly Ala Phe Ala Ser
 275 280 285

Ala Met Val Lys Met Gly Asn Leu Ser Pro Leu Thr Gly Ser Gln Gly
 290 295 300

Gln Val Arg Leu Ser Cys Ser Lys Val Asn
 305 310

<210> 3

<211> 951

ES 2 371 477 T3

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

```

atgttaaagg tgggtgtgtt gatgatgata atgatgttgg cgtcacagtc cgaggetcag    60
ctgaaccgtg acttttaciaa gaaagctgt ccatcattgt tccttgtcgt gagacgagtc    120
gtgaaacggg ccgtggccag agagcctcgc atgggtgctt ctctccttcg tttgttcttc    180
catgattgtt ttgtcaatgg gtgtgacgga tccttactgt tggatgacac accgtctttt    240
ttgggagaga aaacctcagg acccagcaat aectctgtga gggggttcga agtgatcgac    300
aaaatcaagt ttaaggttga gaaaatgtgc ccgggcatcg tctcatgcgc agacattcta    360
gccatcactg ctgggaactc cgttctcctc ctagggtggac cggggtggag cgtgaaactt    420
ggaagaagag actctacgac ggcgaacttc gcggccgcga actccggagt catccctcct    480
ccgatcaeta cccttagcaa cctcataaac cgtttcaaag cacaaggttt gtccacacgt    540
gacatggtcg cctctctggt tgctcacacc attggacgag cccaatgtgt tacattcaga    600
aacccaatct acaacgcaag caatatacgc acctctttcg ccatctctaa acggaggaac    660
tgctctgcca ccagtggctc cggagacaac aagaaagcca atcttgacgt ccgctctccc    720
gataggttcg accacggctt ctacaagcaa cttctgagca aaaaaggttt gcttacgtca    780
gaccaagtcc tctttaataa tggctctacc gactcgctcg tcatagctta cagccacaat    840
ctcaatgcct tetaccgcga ctttgcaagg gcaatgatta agatgggaga catcagcccc    900
ctcaccggat ccaatgtgca gatccgccaa aactgtcgga ggccaactg a                951

```

5 <210> 4

<211> 316

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

```

Met Leu Lys Val Val Leu Leu Met Met Ile Met Met Leu Ala Ser Gln
1           5           10           15

```

10

ES 2 371 477 T3

Ser Glu Ala Gln Leu Asn Arg Asp Phe Tyr Lys Glu Ser Cys Pro Ser
 20 25 30

Leu Phe Leu Val Val Arg Arg Val Val Lys Arg Ala Val Ala Arg Glu
 35 40 45

Pro Arg Met Gly Ala Ser Leu Leu Arg Leu Phe Phe His Asp Cys Phe
 50 55 60

Val Asn Gly Cys Asp Gly Ser Leu Leu Leu Asp Asp Thr Pro Ser Phe
 65 70 75 80

Leu Gly Glu Lys Thr Ser Gly Pro Ser Asn Asn Ser Val Arg Gly Phe
 85 90 95

Glu Val Ile Asp Lys Ile Lys Phe Lys Val Glu Lys Met Cys Pro Gly
 100 105 110

Ile Val Ser Cys Ala Asp Ile Leu Ala Ile Thr Ala Arg Asp Ser Val
 115 120 125

Leu Leu Leu Gly Gly Pro Gly Trp Ser Val Lys Leu Gly Arg Arg Asp
 130 135 140

Ser Thr Thr Ala Asn Phe Ala Ala Ala Asn Ser Gly Val Ile Pro Pro
 145 150 155 160

Pro Ile Thr Thr Leu Ser Asn Leu Ile Asn Arg Phe Lys Ala Gln Gly
 165 170 175

Leu Ser Thr Arg Asp Met Val Ala Leu Ser Gly Ala His Thr Ile Gly
 180 185 190

Arg Ala Gln Cys Val Thr Phe Arg Asn Arg Ile Tyr Asn Ala Ser Asn
 195 200 205

Ile Asp Thr Ser Phe Ala Ile Ser Lys Arg Arg Asn Cys Pro Ala Thr
 210 215 220

Ser Gly Ser Gly Asp Asn Lys Lys Ala Asn Leu Asp Val Arg Ser Pro
 225 230 235 240

Asp Arg Phe Asp His Gly Phe Tyr Lys Gln Leu Leu Ser Lys Lys Gly
 245 250 255

Leu Leu Thr Ser Asp Gln Val Leu Phe Asn Asn Gly Pro Thr Asp Ser
 260 265 270

Leu Val Ile Ala Tyr Ser His Asn Leu Asn Ala Phe Tyr Arg Asp Phe
 275 280 285

Ala Arg Ala Met Ile Lys Met Gly Asp Ile Ser Pro Leu Thr Gly Ser
 290 295 300

Asn Gly Gln Ile Arg Gln Asn Cys Arg Arg Pro Asn
 305 310 315

<210> 5

<211> 27

- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Primer
- 5 <400> 5
- agaagtatgt taaagtggt gttgtg 27
- <210> 6
- <211> 23
- <212> ADN
- 10 <213> Artificial
- <220>
- <223> Primer
- <400> 6
- tgacgaagag gtgattattg agc 23
- 15 <210> 7
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 20 <223> Primer
- <400> 7
- cgaggccctt gtgacataca t 21
- <210> 8
- <211> 25
- 25 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Primer
- <400> 8
- 30 acttaggtgt cgttacttg accat 25

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Primer

<400> 9

cgtcacctgcc cttgtacac 20

<210> 10

10 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

15 <400> 10

aacactcac cggaccattc a 21

<210> 11

<211> 26

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 11

gcttattcag cagccaacaa agtaac 26

25 <210> 12

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Primer

<400> 12

ctgtttcaca agtttatggt ccaagtaa 28

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de plantas o bien células de plantas transgénicas con elevada resistencia a los patógenos fúngicos en comparación con plantas o bien células de plantas de tipo silvestre, caracterizado porque abarca las siguientes etapas:

- 5 a) producción de una molécula de ácido nucleico recombinante que incluye los siguientes elementos en orientación 5'-3':
- secuencias reguladoras de un promotor activo en células de plantas,
 - una secuencia de ADN enlazada a ellas de modo operativo, elegida de entre el grupo consistente en:
- 10 i) secuencias de ADN que incluyen secuencias de nucleótidos que son codificados en SEQ ID No. 1,
- ii) secuencias de ADN que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID No. 2, y/o
- 15 iii) secuencias de ADN que sobre la secuencia total de la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID No. 1 exhiben una identidad de secuencia de por lo menos 80%, y en las cuales codifican para una proteína con la actividad de una peroxidasa
- b) transferencia de la molécula de ácido nucleico recombinante de a) a células vegetales y expresión de las secuencias de ADN, y
- 20 c) regeneración de plantas de las células de plantas transformadas donde en la etapa b) ocurre la integración de la molécula de ácido nucleico recombinante de la etapa a) en el genoma vegetal.

2. Molécula aislada de ácido nucleico que contiene una secuencia de ácido nucleico elegida dentro del grupo consistente en:

- i) secuencias de ADN que incluyen secuencias de nucleótidos que son codificados de la SEQ ID No. 1,
- 25 ii) secuencias de ADN que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican para una proteína con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID No. 2, y/o
- iii) secuencias de ADN que incluyen secuencias de nucleótidos que sobre la totalidad de la secuencia de la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID No. 1 exhiben una identidad de secuencia de por lo menos 80%, y que codifican para una proteína con la actividad de una peroxidasa.

30 3. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2, donde la secuencia de ácido nucleico proviene de *Hordeum vulgare*.

4. Proteína recombinante de peroxidasa codificada mediante una secuencia de ácido nucleico como se indica en la reivindicación 1.

5. Molécula recombinante de ácido nucleico que incluye los siguientes elementos en orientación 5'-3':

- 35 - secuencias reguladoras de un promotor activo en células vegetales,
- secuencia de ADN enlazada de modo operativo a ella como se indica en la reivindicación 1.

6. Molécula recombinante de ácido nucleico según la reivindicación 5, que incluye además secuencias reguladoras que puede servir en las células vegetales como señales de transcripción, terminación y/o poliadenilación y las cuales están enlazadas de modo operativo a las secuencias de ADN según la reivindicación 1.

40 7. Molécula recombinante de ácido nucleico según la reivindicación 5, **caracterizada porque** la secuencia de ADN se expresa bajo control de un promotor constitutivo.

8. Molécula recombinante de ácido nucleico según la reivindicación 7, **caracterizada porque** el promotor es el promotor 35S CaMV o el promotor ubiquitina.
9. Molécula recombinante de ácido nucleico según la reivindicación 5, **caracterizada porque** la secuencia ADN se expresa bajo el control de un promotor específico de tejido.
- 5 10. Molécula recombinante de ácido nucleico según la reivindicación 9, **caracterizado porque** el promotor específico de tejido es un promotor específico de epidermis, mesofilo u hoja.
11. Molécula recombinante de ácido nucleico según la reivindicación 5, **caracterizada porque** la secuencia ADN se expresa bajo el control de un promotor inducible.
- 10 12. Molécula recombinante de ácido nucleico según la reivindicación 11, **caracterizada porque** el promotor inducible es un promotor inducible por patógeno o herida.
13. Célula vegetal transgénica que contiene una secuencia de ácido nucleico como se describe en la reivindicación 1, donde la secuencia de ácido nucleico está presente en una cinta de expresión realizada mediante métodos de tecnología genética, en la cual a) la secuencia de ácidos nucleicos o b) una secuencia de control genéticamente unida de modo funcional con las secuencias de ácidos nucleicos o c) a) y b) no se encuentran en su ambiente genético natural.
- 15 14. Células vegetales transgénicas según la reivindicación 13, que exhiben un elevado contenido de una proteína frente a las células de tipo silvestre según la reivindicación 4.
15. Células vegetales transgénicas según las reivindicaciones 13 o 14, que exhiben una elevada resistencia contra los patógenos fúngicos respecto a las células de tipo silvestre.
- 20 16. Células vegetales transgénicas según la reivindicación 15, que exhiben una elevada resistencia frente a los hongos oídio, del óxido y/o septoria.
17. Células vegetales transgénicas según la reivindicación 16, que exhiben una elevada resistencia frente a *formae speciales* de oídio.
- 25 18. Plantas transgénicas así como partes transgénicas de estas plantas, productos transgénicos de cosecha y material transgénico de multiplicación de estas plantas, como protoplastos, células vegetales, callo, semillas, bulbos, estacas, así como los descendientes transgénicos de estas plantas que contienen unas células vegetales según una de las reivindicaciones 13 a 17.
19. Plantas transgénicas según la reivindicación 18, **caracterizadas porque** la planta transgénica es una planta monocotiledónea.
- 30 20. Plantas transgénicas según la reivindicación 19, **caracterizadas porque** las plantas monocotiledóneas son plantas que pertenecen a los géneros Avena(Avena), Triticum (trigo), Secale (centeno), Hordeum (cebada), Oryza (arroz), Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum (mijo) o Zea (maíz).
21. Plantas transgénicas según la reivindicación 18, **caracterizadas porque** las plantas transgénicas son plantas dicotiledóneas.
- 35 22. Plantas transgénicas según la reivindicación 21, **caracterizadas porque** las plantas dicotiledóneas son algodón, leguminosas como frutas de vaina, alfalfa, granos de soya, colza, canola, tomate, remolacha azucarera, patata, plantas ornamentales, girasol, tabaco o árboles.
- 40 23. Empleo de una secuencia de ADN como se indica en la reivindicación 1 para la producción de plantas y células de plantas transgénicas con elevada resistencia a los patógenos fúngicos en comparación con plantas de tipo silvestre o bien células de plantas de tipo silvestre.
24. Empleo según una secuencia de ADN como se indica en la reivindicación 1 para la identificación de plantas que muestran una resistencia de no huésped frente a patógenos fúngicos.
25. Empleo de una secuencia de ADN como se indica en la reivindicación 1 como marcador para resistencia de no huésped en cereales.

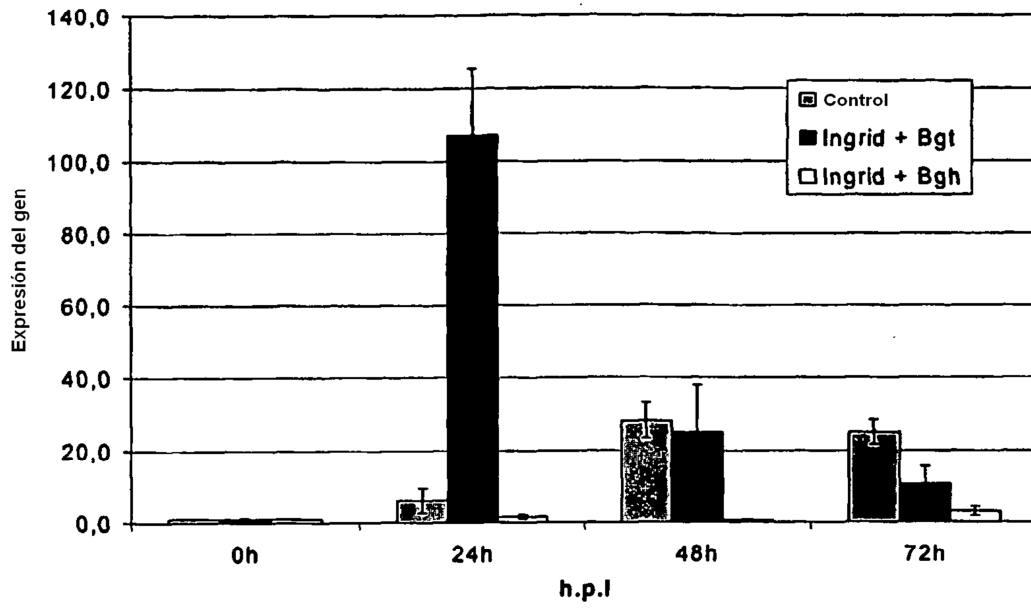


Ilustración 1