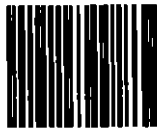


PETITORIO



01 23525
FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 01023525 00000000 Folios: 115
Fecha (UND): 2001-03-23 17:21:11
Tramite : 002 PATENTES 0 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

①

SOLICITUD DE :

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: EDEN BIOSCIENCE
CORPORATION.
Dirección: 1816 North Creek Parkway N.
Bothell, Washington 98011-8205
Teléfono: 570-0010 Fax: 285-6908
E-Mail: _____
Domicilio: Estados Unidos de América

IDENTIFICACION

G.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Número: _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: CALLE 35 No. 7-25 Piso 4
Teléfono: 570-0010 Fax: 285-6908
E-Mail: patents.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Número 79.782.747 TP 74.295

④

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: (1) XIAOLING SONG, (2) HAQ FAN,
(3) ZHONG-MIN WEI
Dirección: (1) 14110 NE 179th Street, Apt.75 Woodinville,
Washington 98072 USA; (2) 19712 6th Drive S.E.
Bothell, Washington 98012 USA; (3) 8230 125th Court Kirkland,
Washington 98034 USA.
Teléfono: _____ Fax: _____
E-Mail: _____
Domicilio: _____

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Número: _____

⑤

Título (54)

RECEPTORES DE INDUCTORES DE LA RESPUESTA HIPERSENSIBLE Y USOS DE LOS
MISMOS.

⑥

Clasificación Internacional (51)

C07K 14/415, C12N 15/29

⑦

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US _____
US _____

(32) Fecha

Marzo 23, 2000 ☒
Diciembre 1, 2000 ☒

(31) Número de Solicitud

60/191,649
60/250,710

⑧

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☐ Otro ☐

⑨

Comprobante de pago No. 10,673; 15,720

Fecha: Febrero 21, 2001; Marzo 9, 2001

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

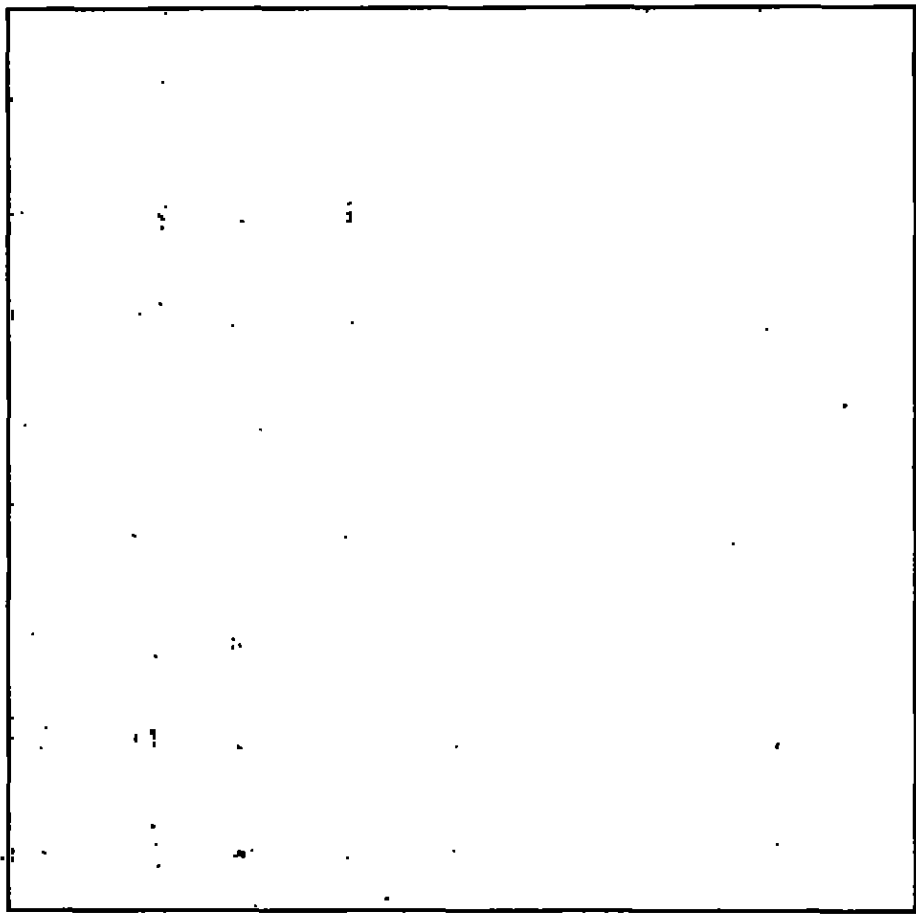
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o as causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones.
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE:

CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 de Bñ T.P. 74.295



3.

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 15,720
FECHA : MARZO 9 DE 2001

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Indicacion : 01023525 00000000 Folios: 115
Fecha (IMP): 2001-03-23 17:21:11
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAL
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
JORGE LUIS GOMEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3292138	08/03/2001	18,563,400.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	356,640.00
TOTAL :			\$ 356,640.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA Y SEIS MIL SEISCIENTOS CUARENTA PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: Info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



4

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 01023525 00000000

Folios: 115

Fecha (HH): 2001-02-23 17:21:11

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAL

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 10,673
FECHA : FEBRERO 21 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
JORGE LUIS GOMEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3303982	21/02/2001	14,672,800.

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.00
	TOTAL :	\$ 100,000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

5.

**RECEPTORES DE INDUCTORES DE LA RESPUESTA HYPERSENSIBLE Y
USOS DE LOS MISMOS**

Esta solicitud reivindica el beneficio sobre las Solicitudes de Patente Provisionales U.S. Nos. Seriales 60/191.649, presentada el 23 de marzo de 2000 y 60/250.710 presentada el 1 de diciembre de 2000.

CAMPO DEL INVENTO

El presente invento se relaciona con receptores de inductores de respuesta hipersensible y usos de los mismos.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

Las plantas han evolucionado un conjunto complejo de vías bioquímicas que las permiten reconocer y responder a señales ambientales, incluyendo la infección patógena. Existen dos tipos principales de interacciones entre un patógeno y la planta - compatible e incompatible. Cuando un patógeno y una planta son compatibles, la enfermedad usualmente se da. Si un patógeno y una planta son incompatibles, la planta usualmente resulta resistente a ese patógeno en particular. En una interacción incompatible, la planta restringirá la proliferación del patógeno causando una necrosis localizada, o muerte de tejidos, en una pequeña zona que circundaba el sitio de infección. Esta reacción por la planta es definida como

/

5
6

la respuesta hipersensible ("RH") (Kiraly, Z. "Defensas Engatilladas por el Invasor: Hipersensibilidad," Enfermedad Botánica: Un Tratado Avanzado 5:201-224 J.G. Horsfall y E.B. Cowling, eds. Academic Press, Nueva York (1980); (Klement "Hipersensibilidad", Procariontes Fitopatogénicos 2:149-177, M.S. Mount y G.H. Lacy, eds. Academic Press, Nueva York (1982)). La muerte celular localizada no solo contiene el patógeno infectante y evita que se esparza más aún sino también conduce a una resistencia sistémica previniendo unas infecciones subsecuentes por otros patógenos. Por lo tanto, RH es una forma común de resistencia botánica a enfermedades causadas por bacterias, hongos, nemátodos, y virus.

Un conjunto de genes llamadas *hrp* (Respuesta Hipersensible y Patogenicidad) es responsable por la inducción de la RH por bacterias patogénicas, incluyendo *Erwinia* spp, *Pseudomonas* spp, *Xanthomonas* spp, y *Ralstonia solanacearum* (Willis et al., "Genes *hrp* de Bacterias Fitopatogénicas," Mol. Plant-Microbe Interact. 4:132-138 (1991), Bonas, U. "Genes *hrp* de Bacterias Fitopatogénicas," páginas 79-98 en: Temas Actuales en Microbiología e Inmunología, Vol. 192, Patogénesis Bacteriana de Plantas y Animales: Mecanismos Celulares y Moleculares. J.L. Dangl, ed. Springer-Verlag, Berlin (1994); Alfano et al., "Patógenos Bacterianos en Plantas: La Vida contra la pared," Plant Cell 8:1683-98 (1996). Típicamente, existen múltiples genes *hrp* agrupados en un ADN de 30-40 kb. Una mutación en cualesquiera de los genes *hrp* resultaría en la pérdida de la patogenicidad

21
7

bacteriana in plantas hospedero y la RH en plantas no hospedero. Con base en la caraterización genética y bioquímica, la función de los genes *hrp* puede ser clasificada en tres grupos: 1) genes estructurales que codifican inductores de RH extracelularmente situados, por ejemplo harpin de *Erwinia amylovora* (Wei, et al., "Harpin, Un Inductor de la Respuesta Hipersensible Producido por el Patógeno Vegetal, *Erwinia amylovora*," Science 257:85 (1992)); 2) genes de secreción que codifican un aparato secretorio para exportar inductores de la RH y otras proteínas desde el citoplasma bacteriano hacia la superficie celular o el espacio extracelular (Van Gijsegem et al., "Conservación Evolutiva de los Determinantes de la Patogenicidad Entre Bacterias Patogénicas de Plantas y Animales," Trends Microbiol. 1:175-180 (1993); He et al., "Pseudomonas syringae pv. Syringae harpin_{psa}: Una proteína la cual es secretada por la Vía Hrp e induce la Respuesta Hipersensible en Plantas," Cell 73:1255 (1993); Wei et al., "HrpI de *Erwinia amylovora* funciona en la secreción de harpin y es un miembro de una Nueva Familia Proteica," J. Bacteriol. 175:7985-67 (1993), Arlat et al. "PopA1, una Proteína la cual induce una respuesta tipo hipersensible sobre Genotipos de Petunia Específicos, es secretada por la Vía Hrp de *Pseudomonas solanacearum*," EMBO J. 13:543-53 (1994), Galan et al., "Comunicación entre Patógenos Bacterianos y sus Células Hospedero," Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 12:221-55 (1996); Bogdanove et al., "*Erwinia amylovora* secreta Harpin por medio de la Vía Tipo III y

contiene un Homólogo de yopN de *Yersinia*," J. Bacteriol. 178:1720-30 (1996); Bogdanove et al., "Homología y Similitud Funcional de un Operón de Patogenicidad ligado a hrp, dspEF, de *Erwinia amylovora* y el sitio avrE del *Pseudomonas syringae* tomate p.v.," Proc Natl Acad Sci USA 95:1325-30 (1988)); y 3) genes de regulación que controlan la expresión de genes hrp (Wei, Z. M., "Harpin, Inductor de la Respuesta Hipersensible Producido por el Patógeno Vegetal *Erwinia amylovora*," Science 257:85 (1992); Wei et al., "hrpL Activa los Genes hrp *Erwinia amylovora* en respuesta de estímulos ambientales", J. Bacteriol. 174:1875-82 (1995); Xiao et al., "Una secuencia promotora única reconocida por una Factor Sigma Alterno recientemente identificado dirige la expresión de patogenicidad y determinantes de rango hospedero en *Pseudomonas syringae*," J. Bacteriol. 176:3089-91 (1994); Kim et al., "Operones hrpA y hrpC de *Erwinia amylovora* codifican componentes de una Vía Tipo III que secreta Harpin", J. Bacteriol. 179:1690-97 (1997); Kim et al., "HrpW de *Erwinia amylovora*, una nueva Harpin que contiene un Dominio que es homólogo a Liasas de Pectato de una Clase Distinta," J. Bacteriol. 180:5203-10 (1998); Wengelnik et al., "HrpG, Una proteína de regulación hrp clave de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* es Homóloga con Reguladores de Respuesta de Dos Componentes," Mol. Plant-Microbe Interact. 9:704-12 (1996)). Debido a su papel en las interacciones entre plantas y microbios, los genes hrp han sido un punto de estudio de patogenicidad bacteriana y defensas vegetales.

2
9

Además de la respuesta de defensa local, la RH también activa el sistema de defensa en partes no infectadas de la misma planta. Esto resulta en una resistencia sistémica general a una infección secundaria denominada Resistencia Adquirida Sistémica ("SAR") (Ross, R.F. "Resistencia Adquirida Sistémica Inducida por Infecciones Virales Localizadas en plantas," Virology 14:340-58 (1961); Malamy et al., "Acido Salicílico y Resistencia a Enfermedades Vegetales," Plant J. 2:643-654 (1990)). SAR confiere una resistencia a enfermedades sistémicas de larga duración contra un amplio espectro de patógenos y está asociado con la expresión de ciertos genes (Ward et al., "Actividad Genética Coordinada en respuesta a agentes que inducen resistencia adquirida sistémica," Plant Cell 3:1085-94 (1991)). SAR es un componente importante de la resistencia a enfermedades de plantas y ha sido de mucho interés por cierto tiempo, puesto que el potencial de inducir la planta a protegerse podría reducir de manera significativa o eliminar la necesidad de pesticidas químicos. SAR puede ser inducido por agentes bióticos (microbios) o abióticos (químicos) (Gorlach et al. "Benzotiadiazol, Una Nueva Clase de Inductores de Resistencia Adquirida Sistémica, Activa Expresión Genética y Resistencia a las Enfermedades en el Trigo," Plant Cell 8:629-43 (1996)). Históricamente, unos patógenos virulentos débiles fueron usados como un agente bióticamente inductor para SAR. Bacterias que promueven el crecimiento vegetal no virulentas también se reportaron en ser capaces de inducir resistencia de

5

Z
10

algunas plantas contra varias enfermedades. SAR inducido con agentes bióticos ha sido el tema de mucha investigación, especialmente al final de los 70 y comienzo de los 80. Sin embargo, se ha logrado un éxito muy limitado debido a: 1) inconsistencia del desempeño de organismos vivientes en diferentes condiciones ambientales; 2) unas inquietudes considerables con respecto a las consecuencias no predecibles de la introducción intencional de patógenos débilmente virulentos en el ambiente; y (3) la complicación técnica de aplicar un microorganismo viviente en diferentes condiciones ambientales. Para superar las limitaciones de usar organismos vivientes para inducir SAR, científicos han estado buscando hace tiempo por un inductor de la RH derivado de un patógeno para la inducción de SAR. Con el avance de la biología molecular, el primer inductor de la RH proteico con un amplio espectro de hospederos fue aislado en 1992 a partir de *Erwinia amylovora*, una bacteria patogénica que causa el fuego bacteriano en manzanas y peras. El inductor de la RH fue nombrado "harpin". Consiste de 403 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 40 kDa. La proteína harpin es termo-estable y rica en glicina con cero cisteína. El gen que codifica la proteína harpin se encuentra un fragmento de ADN de 1.3 kB en el medio del cúmulo genético *hrp*. La harpin es secretada en el espacio extracelular y es muy sensible a la digestión por proteinasas. Puesto que la primera harpin fue aislada a partir de *Erwinia amylovora*, varias

K
11

proteínas harpin o tipo harpin han sido aisladas a partir de grupos principales de bacterias patogénicas vegetales. Adicionalmente a la harpin de *Erwinia amylovora*, las siguientes proteínas harpin o tipo harpin han sido aisladas y caracterizadas: HrpN de *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* (Wei et al., "Harpin, Un Inductor de la Respuesta Hipersensible Producido por el Patógeno Vegetal, *Erwinia amylovora*," Science 257:85 (1992), *Erwinia stewartii*; HrpZ de *Pseudomonas syringae* (He et al., "Pseudomonas syringae pv. Syringae harpin_{pas}: Una proteína la cual es secretada por la Vía Hrp e induce la Respuesta Hipersensible en Plantas," Cell 73:1255 (1993)), PopA de *Ralstonia solanacearum*, (Arlat et al. "PopA1, una Proteína la cual induce una respuesta tipo hipersensible sobre Genotipos de Petunia Específicos, es secretada por la Vía Hrp de *Pseudomonas solanacearum*," EMBO J. 13:543-53 (1994)); HrpW de *Erwinia amylovora* (Kim et al., "HrpW de *Erwinia amylovora*, una nueva Harpin que contiene un Dominio que es homólogo a Liasas de Pectato de una Clase Distinta," J. Bacteriol. 180:5203-10 (1998)), y *Pseudomonas syringae*. Todas las proteínas harpin y tipo harpin recién descritas comparten características comunes. Son proteínas termoestables y ricas en glicina con ningún residuo del aminoácido cisteína, y son muy sensibles a la digestión por parte de las proteinasas, e inducen la RH e inducen resistencia en muchas plantas contra muchas enfermedades. Con base en sus características bioquímicas y biofísicas como también en sus funciones biológicas, estos inductores de la RH de

diferentes bacterias patogénicas forman parte de una nueva familia de proteínas, es decir, la familia de proteínas harpin. Las características descritas, especialmente su capacidad de inducir la RH en un amplio espectro de plantas, distinguen la familia de proteínas harpin de otros inductores de la RH proteicos específicos, por ejemplo inductinas a partir de *Fitoftora* spp (Bonnet et al., "Resistencia Adquirida activado por inductores en Tabaco y otras plantas," Eur. J. Plant Path. 102:181-92 (1996); Keller, et al., "Características Fisiológicas y Moleculares de Resistencia Adquirida Sistémica inducida por inductinas en Tabaco", Plant Physiol 110:365-76 (1996)) o proteínas de avirulencia (tales como Avr9) a partir de *Cladosporium fulvum*, las cuales solo son capaces de inducir la RH en una variedad o especie específica de una planta.

En la naturaleza, cuando ciertas infecciones bacterianas ocurren, la proteína harpin es expresada y luego secretada por las bacterias, dándole señal a la planta que monte una defensa contra la infección. La harpin sirve como una señal para activar la defensa vegetal y otros sistemas fisiológicos, que incluyen SAR, aumento del crecimiento, y resistencia a ciertos daños por insectos.

El entendimiento actual de moléculas vegetales críticas que puedan tener un papel en la interacción con inductores y luego la activación de una cascada de transducción de la señal secuencial está descrita a continuación.

Interacción de genes de resistencia vegetal (R) y genes de avirulencia patógena (avr)

El concepto de interacción gen por gen es que "para cada gen determinando resistencia (gen R) en el hospedero, hay un gen correspondiente determinando avirulencia en el patógeno (gen avr)". En este modelo, los genes de avirulencia patógena generan una molécula ligando específica, llamada un inductor. Solamente las plantas que llevan el gen de resistencia correspondiente responden a este inductor e invocan el HR. En años pasados, varios genes R de resistencia a enfermedades, han sido clonados y secuenciados. Se esperaba que los genes R pudieran codificar componentes involucrados en el reconocimiento de señales o rutas de transducción de señales que finalmente llevaran a respuestas de defensa. Los genes R clonados podrían ser agrupados en cuatro clases: (1) protein-quinasa citoplásmica; (2) protein-quinasas con un dominio extracelular; (3) proteínas citoplásmicas con una región de repeticiones ricas en leucina y un sitio de unión de nucleótidos; y (4) proteínas con una región de repeticiones ricas en leucina que parecen codificar proteínas extracelulares. (Reseña en Bent, A.F. "Genes de Resistencia a Enfermedades Vegetales: La Estructura Enfrenta a la Función," Plant Cell 8:1757-71 (1996); Baker B., "Señalización en Interacciones Planta-Microbio," Science 276:726-33 (1997)). El primer gen R clonado, Pto, codifica una

X
64

protein-quinasa de serina/treonina. El producto de la proteína de Pto interactúa directamente con la proteína del gen de avirulencia análogo, AvrPro, lo cual ha sido demostrado en un sistema de levadura de dos híbridos. Se mostró que solamente la coexistencia de ambas proteínas AvrPro y Pto podría producir HR en las plantas (Tang, "Iniciación de Resistencia a Enfermedades Vegetales Mediante Interacción Física de quinasa AvrPto y Pto," Science 274:2060-63 (1996); Scofield, Base Molecular de Especificidad de Gen por Gen en Enfermedad de Mancha Bacteriana en el Tomate," Science 274:2063-65 (1996); Zhou., "La quinasa Pto Confiriendo Resistencia a Enfermedad de la Mancha Bacteriana en el Tomate Interactúa con Proteínas que Unen un cis-elemento de genes relacionados con Patogenesis," EMBO J. 16:3207-18 (1997)). Los resultados de los genes R clonados soportan la opinión que las interacciones planta-patogeno involucran interacciones proteína-proteína. Siringólido, un inductor de bajo peso molecular soluble en agua, activa una respuesta de defensa en cultivares de soya llevando el gen de resistencia a enfermedades Rpg4. Una proteína 34-KDa ha sido aislada a partir de la soya y es considerada como el receptor de siringolido fisiológicamente activo (Ji, "Caracterización de una Proteína de Unión de Soya para los inductores de siringolido," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3306-11 (1998)).

Factor de Posible Unión de Inductina

Las inductinas son una familia de pequeñas proteínas secretadas por las especies *Phytophthora* que tienen un alto grado de homología. Las inductinas puras solas pueden causar una respuesta hipersensitiva, una muerte celular local, y activar resistencia sistémica adquirida en plantas de tabaco y otros vegetales (Bonnet, "resistencia adquirida activada por inductores en tabaco y otras plantas," Eur. J. Plant Path. 102:181-92 (1996); Keller, "Características Fisiológicas y Moleculares de Resistencia Adquirida Sistémica Inducida por Inductinas en Tabaco," Plant Physiol 110:365-76 (1996)). Sin embargo, el espectro de inducción HR y resistencia sistémica inducida en plantas es mucho más delgado que aquel logrado por inductores de la familia harpin. Como la proteína harpin, las inductinas inducen una serie de eventos metabólicos en células de tabaco, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, producción de etileno, filtración de electrolitos de transmembrana, acumulación de H₂O₂, y expresión de genes relacionados con defensa de plantas (Yu I., "Inductinas de *Phytophthora* y Resistencia Básica en Tabaco," Proc. Natl. (1995); Keller, Producción de Inductina Inducida por Patógenos en Tabaco Transgénico Genera Una Respuesta Hipersensitiva y Resistencia a Enfermedades no Específicas, The Plant Cell 11:223-35 (1999)). Un factor de posible unión tipo receptor ha sido identificado en la membrana plasmática del tabaco, la cual tiene una alta afinidad específica con la

critogeina, un miembro de la familia de la inductina (Wendehenne, "Evidencia de Sitios de Unión de Alta Afinidad Específicos para un Inductor Proteinaceo en Membrana Plasmatica del Tabaco," FEBS Letters 374:203-207 (1995)). Recientemente, se encontró que 2 inductinas básicas (es decir, criptogeina y cinnamomina) y dos inductinas acidicas (es decir, capsiceina y parasiticeina) pudieron interactuar con los mismos sitios de unión sobre membranas plasmáticas del tabaco (Bourque, Comparación de Propiedades de Unión y Efectos Biológicos Tempranos de Inductinas en Celulas de Tabaco," Plant Physiol. 118:1317-26 (1998)). Sin embargo, el gen del factor tipo receptor no ha sido aislado.

Factor de Posible Unión de Inductores de Glicoproteínas

Un inductor de glicoproteínas de 42 KDa ha sido aislado a partir de *Phytophthora megasperma* (Parker, "Una Glicoproteina Extracelular de *phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* Produce Sintesis de Fitoalexina en Células de Perejil Cultivadas y Protoplastos, Mol. Plant Microbe Interact. 4:19-27 (1991)). Un oligopeptido de 13 aminoacidos dentro de la glicoproteina ("Pep-13") pudo inducir una respuesta en plantas como la lograda mediante la glicoproteína completa. Un patrón de unión de alta afinidad ha sido observado en membranas microsomales del perejil con un oligopéptido rotulado con un isótopo. Hay estimados aproximadamente 1600 a 2900 sitios de unión por célula con evidencia indicando que un receptor proteico

17
22

abundante bajo el Pep-13 está localizado en la membrana plasmática (Numberger, "La Unión de Alta Afinidad de un Inductor Oligopeptido Micotico a Membranas Plasmaticas de Perejil Activa Múltiples Respuestas de Defensa," Cell 78:449-60 (1994)).

Factores de Unión de la Proteína Harpin

Las proteínas harpin, las cuales producen HR en una variedad de diferentes plantas no hospedero, han sido aisladas a partir de patógenos vegetales (Wei, "Harpin, Inductor de la Respuesta hipóersensitiva producida por el patógeno vegetal *Erwinia amylovora*," Science 257:85 (1992)). Una familia de proteínas harpin ha sido identificada a partir de patógenos bacterianos vegetales. Todas estas tienen actividades biológicas similares. Está bien documentado que la proteína harpin puede inducir producción de oxígeno activo en las plantas, cambiar el flujo de iones, llevar a muerte celular local, e inducir resistencia adquirida sistémica ("SAR") (Wei, "Harpin, Inductor de la Respuesta Hípersensitiva Producida por el Patogeno Vegetal *Erwinia amylovora*," Science 257:85 (1992); He, "*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Harpin_{ps}: Una Proteína que Es Secretada a Través de la Ruta Hrp y Produce la Respuesta Hípersensitiva en Plantas," Cell 73:1255-66 (1993); Baker, C.J., "harpin, un inductor de la respuesta hipóersensitiva en tabaco Causada por *Erwinia amylovora*, Fomenta la Producción de Oxígeno Activo en Células de Suspensión," Plant Physiol. 102:1341-44

(1993)). Hasta el momento ningún factor de unión de la proteína harpin ha sido aislado. Se reportó que una proteína anfipática, llamada HRAP, aislada a partir de pimiento dulce podría disociar la proteína harpin_{p56} en forma multimérica (hrpZ a partir de *Pseudomonas syringae*). La actividad biológica de la HRAP es considerada como su capacidad para intensificar la respuesta hipersensitiva mediada por la proteína harpin_{p55}. La proteína HRAP no se une a la harpin_{p55} directamente (Chen, "una proteína anfipática de pimiento dulce puede disociar formas multiméricas de harpin_{p55} e intensificar la respuesta hipersensitiva mediada por harpin," Physiological & Pathology 52:139-49 (1998)). Utilizando un anticuerpo contra harpin etiquetado con fluorocromo para examinar la interacción de la proteína harpin y células de suspensión de tabaco, se encontró que harpin_{p55} interactuó con las células cultivadas, pero no con protoplastos con las paredes celulares siendo digeridas y removidas. Se interpretó que la proteína harpin_{p55} estaba localizada en la porción exterior de la célula vegetal, probablemente sobre la pared celular. Sin embargo, no se descartó que el factor de unión estuviera localizado sobre la membrana plasmática.

El presente invento busca identificar receptores para proteínas o polipéptidos inductores de respuesta hipersensitiva y utiliza tales receptores.

RESUMEN DEL INVENTO

El presente invento está dirigido a una proteína aislada la cual sirve como un receptor en plantas para un inductor de respuesta hipersensitiva patógena vegetal. También se divulgan moléculas de ácido nucleico que codifican tales receptores así como también vectores de expresión, células hospedero, plantas transgénicas, y semillas de plantas transgénicas que contienen tales moléculas de ácido nucleico.

La proteína del presente invento puede ser utilizada como un método para identificar agentes de rotulación de células vegetales mediante la formación de una mezcla de reacción incluyendo la proteína y un agente candidato, evaluando la mezcla de reacción para unión entre la proteína y el agente candidato, e identificando los compuestos candidatos los cuales se unen a la proteína en la mezcla de reacción como agentes rotuladores de células vegetales.

La molécula de ácido nucleico del presente invento puede ser utilizada en un método de identificación de agentes rotuladores de células vegetales mediante la formación de una mezcla de reacción incluyendo una célula transformada con la molécula de ácido nucleico del presente invento y un agente candidato, evaluando la mezcla de reacción para unión entre la proteína producida mediante la célula hospedero y el agente candidato, e identificando los compuestos candidatos los cuales se unen a la proteína o a la célula hospedero en la mezcla de reacción como agentes rotuladores de células vegetales.

Otro aspecto del presente invento se relaciona con un método para aumentar la receptividad de una planta a tratamiento con inductores de respuesta hipersensitiva suministrando una planta transgénica o semilla de planta transgénica transformada con la molécula de ácido nucleico del presente invento.

El presente invento también está dirigido a un método para impartir resistencia a enfermedades, aumentar crecimiento, controlar insectos, y/o impartir resistencia al estrés a plantas suministrando una planta transgénica o semilla de planta transgénica transformada con una construcción de ADN efectiva para silenciar la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor según el presente invento.

El descubrimiento del presente invento tiene gran significado. Esta posible proteína receptora puede ser utilizada como una forma novedosa para clasificar nuevos inductores de resistencia vegetal contra insectos, enfermedades, y estrés, y de aumento de crecimiento. Esta proteína es el primer paso hacia el entendimiento de la ruta de transducción de señales inducida por la proteína harpin en plantas. Estudios adicionales de esta ruta suministrarán más objetivos posibles para el crecimiento de productos de aumento de crecimiento y nuevas vacunas vegetales. Además, esta proteína puede servir como un anclaje suministrando una nueva forma para señalar cualquier cosa hacia las células vegetales.

Breve descripción de las ilustraciones

La figura 1 muestra un monitoreo de dos híbridos en levadura con el inductor de respuesta hipersensible *Erwinia amylovora* (es decir, harpin) y una representación esquemática de la interacción entre harpin y un polipéptido codificado por ADNc. La proteína harpin es fusionada con la proteína LexA la cual contiene un dominio de unión de ADN ("BD"). El polipéptido codificado ADNc es fusionado con el dominio de activación de transcripción GAL4 ("AD"). Esta interacción señala el dominio de activación hacia dos promotores dependientes de LexA con activación consecuente de la transcripción de los genes reporteros *HIS3* y *IacZ*.

Las Figuras 2A-B muestran que el inductor de respuesta hipersensible *Erwinia amylovora* (es decir harpin) es un buen anzuelo para el sistema de dos híbridos en levadura. Los genes reporteros no fueron expresados en la levadura cepa L40 que contiene plásmidos expresando la fusión LexA - harpin en combinación con plásmidos expresando sólo el dominio de activación de GAL4, o fusionados con proteína no relacionada. Por lo tanto, la proteína harpin no es autoactiva en este sistema de dos híbridos en levadura. Además, los genes reporteros no fueron expresados en el almidón cepa L40 que contiene plásmidos expresando la fusión de dominio de activación GAL4 con la proteína harpin en combinación con plásmidos expresando sólo LexA, o fusionados con la proteína no relacionada. La figura 2A muestra un ensayo de beta-galactosidasa donde el color azul indica la

expresión del gen reportero *lacZ*. La figura 2B muestra una placa de medios mínimos sintéticos ("SD") la cual carece de leucina, triptofano, e histidina. El crecimiento de tal placa indica la expresión del gen reportero *HIS3*.

Las figuras 3A-B muestran la interacción entre HrBP1 (proteína de unión de inductor de respuesta hipersensitiva 1) y un inductor de respuesta hipersensitiva (es decir, harpin) es específico. Los genes reporteros fueron expresados en la levadura cepa L40 que contiene plásmidos expresando la fusión del dominio de activación GAL4 con HrPB1 en combinación con plásmidos expresando Lex A fusionada con el inductor de respuesta hipersensitiva (es decir, harpin), pero no fueron expresados en combinación con sólo LexA, o LexA fusionada con proteínas no relacionadas. La figura 3A es un ensayo de beta-galactosidasa donde el color azul indica la expresión de un gen reportero *lacZ*. La figura 3B es una placa de medios SD la cual carece de leucina, triptofano, e histidina. El crecimiento sobre tal placa indica la expresión del gen reportero *HIS3*.

Las figuras 4A-B muestran la interacción de HrBP1 y un inductor de respuesta hipersensitiva (es decir, harpin) en otra orientación. Los genes reporteros fueron expresados en el almidón cepa L40 conteniendo plásmidos expresando la fusión LexA - HrBP1 en combinación con plásmidos expresando el dominio de activación GAL4 fusionado con harpin, cuando no fueron expresados en combinación con sólo el dominio de activación GAL4, o el

dominio de activación GAL4 fusionado con proteínas no relacionadas. Por lo tanto, la interacción entre harpin y HrBP1 es específica. La figura 4A muestra un ensayo de beta-galactosidasa donde el color azul indica la expresión del gen reportero *lacZ*. La figura 4B muestra una placa de medios SD la cual carece de leucina, triptofano, e histidina. El crecimiento tal placa indica la expresión del gen reportero *HIS3*.

La figura 5 muestra la estructura genética de HrBP1 y una representación esquemática de los exones e intrones del gen. Al comparar la secuencia de ADNc de HrBP1 con la secuencia del ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* publicada en una base de datos pública cuatro exones y tres intrones fueron descubiertos.

La figura 6 muestra un Northern blot utilizando sonda de ARN complementario a las bases 651-855 de la región codificadora de BrBPI (SEQ. ID. No. 9).

Las figuras 7A-B muestran que la interacción entre rHrBPI (R6) y harpin es específica. Los genes reporteros fueron expresados en el almidón cepa L40 conteniendo plásmidos que expresan la fusión del dominio de activación GAL4 con la HrBP1 en combinación con plásmidos que expresan LexA fusionada con harpin o 137-180 aminoácidos de harpin, pero no fueron expresados en combinación con solamente LexA, LexA fusionada con proteínas no relacionadas, o fusionada con 210-403 aminoácidos de harpin. La figura 7A muestra un ensayo de beta-galactosidasa donde el color azul indica la expresión del gen reportero *lacZ*. La figura 7B muestra

una placa de medios SD, la cual carece de leucina, triptofano, e histidina. El crecimiento sobre tal placa indica la expresión del gen reportero *HIS3*.

La figura 8 muestra las construcciones utilizadas para hacerle "nocaut" al gen *HrBP1* en *Arabidopsis*.

Las figuras 9A-C muestran un ensayo de tomate DC3000 de *Pseudomonas syringae* p.v. sobre tipo silvestre y plantas de *Arabidopsis* transgénica "nocaut" *HrBP1*. La figura 9A es una foto tomada 7 días después de la inoculación con *P. syringae*. En la figura 9B, se cosecharon discos de hoja. Se extrajeron bacterias de los discos de hoja y se sembraron sobre la placa de agar B de King que contiene 100ug/ml de rifampicina. La figura 9C muestra el conteo de bacterias de las placas de la figura 9B. Esto significa una línea anti-sentido y d se refiere a una línea de ARN de dos hebras.

La figura 10 muestra la construcción utilizada para sobreexpresar *HrBP1* en tabaco.

La figura 11A-B muestra la altura del tipo silvestre y las plantas sobre-expresando *HrBP1* de tabaco 52 días después de ser transferidas a la tierra. La Figura 11A es una fotografía tomada 52 días después de transferir las plantas a la tierra. La figura 11B muestra la altura promedio de 8 plantas por línea.

Las Figuras 12A-B muestran resultados de un ensayo TMV sobre plantas de tabaco de tipo silvestre y de sobreexpresión de *HrBP1*. La Figura 12B muestra el diámetro de lesión de virus promedio de 5 plantas por línea 3 días después de inoculación TMV.

25-28

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

El presente invento está dirigido a aislar receptores para proteínas o polipéptidos inductores de la respuesta hipersensible. También están mencionadas las moléculas de ADN que codifican éstos receptores, al igual que los sistemas de expresión, las células hospederas y las plantas que contienen dichas moléculas. Los usos de los receptores y las moléculas de ADN que las codifican están mencionados. El receptor de un inductor de la respuesta hipersensible de un fitopatógeno puede ser de una monocotiledónea o dicotiledónea.

Un ejemplo de éste receptor es el encontrado en *Arabidopsis thaliana* el cual tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ.ID. No. 1 siguiente:

Met	Ala	Thr	Ser	Ser	Thr	Phe	Ser	Ser	Leu	Leu	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala
1				5					10				15		
Leu	Leu	Ser	Asp	His	Arg	Ser	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Arg	Tyr	Ser	Phe
			10					25					30		
Ser	Pro	Leu	Thr	Thr	Pro	Lys	Ser	Ser	Arg	Leu	Gly	Phe	Thr	Val	Pro
		35					40					45			

Glu Lys Arg Asn Leu Ala Ala Asn Ser Ser Leu Val Glu Val Ser Ile
 50 55 60
 Gly Gly Glu Ser Asp Pro Pro Pro Ser Ser Ser Gly Ser Gly Gly Asp
 65 70 75 80
 Asp Lys Gln Ile Ala Leu Leu Lys Leu Lys Leu Leu Ser Val Val Ser
 85 90 95
 Gly Leu Asn Arg Gly Leu Val Ala Ser Val Asp Asp Leu Glu Arg Ala
 100 105 110
 Glu Val Ala Ala Lys Glu Leu Glu Thr Ala Gly Gly Pro Val Asp Leu
 115 120 125
 Thr Asp Asp Leu Asp Lys Leu Gln Gly Lys Trp Arg Leu Leu Tyr Ser
 130 135 140
 Ser Ala Phe Ser Ser Arg Ser Leu Gly Gly Ser Arg Pro Gly Leu Pro
 145 150 155 160
 Thr Gly Arg Leu Ile Pro Val Thr Leu Gly Gln Val Phe Gln Arg Ile
 165 170 175
 Asp Val Phe Ser Lys Asp Phe Asp Asn Ile Ala Glu Val Glu Leu Gly
 180 185 190
 Ala Pro Trp Pro Phe Pro Pro Leu Glu Ala Thr Ala Thr Leu Ala His
 195 200 205
 Lys Phe Glu Leu Leu Gly Thr Cys Lys Ile Lys Ile Thr Phe Glu Lys
 210 215 220
 Thr Thr Val Lys Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Ile Pro Pro Phe Asp
 225 230 235 240
 Ile Pro Arg Leu Pro Asp Ser Phe Arg Pro Ser Ser Asn Pro Gly Thr
 245 250 255
 Gly Asp Phe Glu Val Thr Tyr Val Asp Asp Thr Met Arg Ile Thr Arg
 260 265 270
 Gly Asp Arg Gly Glu Leu Arg Val Phe Val Ile Ala
 275 280

Esta proteína, conocida como HrbPlp, está codificada
 por una molécula de ADNc que tiene la SEQ. ID. No. 2 como
 sigue:

tttttctctc tcaacatgg agacttcttc tactttctcg tcaactactac cttaacacac 60
 agctctctct tccgacccac gtctctctcc accatccatc agatactctt tttctctctt 120
 aactactcca aatcagcttc gtctgggttt cactgtaccg gagaagagaa acctcgtctg 180
 taattcgtct ctgcttgaaag tatccattgg cggagaaagt gaccacccac catctctctc 240
 tggatcaggg ggagacgaca agcaaatctgc attactcaaa ctcaaatcac ttagtgtagt 300
 ttccggatta aacagaggac ttgtggcgag tgttgatgat ttagnaagag ctgaagtggc 360
 tgcataagaa ctgcaaatctg ctgggggacc ggttgattta accgatgac ttgataagct 420
 tcaagggaaa tggaggtctg tgtatagtat tggctctctt tctcggctct taggtggtag 480
 ccgtctctgt ctactctctg gacgtttgat cctgttact ctgggcacag tgtttcaag 540

gattgatgtg tttagcaag atttctgata catagcagag gtggaattag gaggcccttg 600
 gccatttccg ccattagaa ccactgagac attggcacac aagtttgaac tcttaggcac 660
 ttgcaagac aagataacat ttgagaaac aactgtgag acatcggga acctgtctca 720

atgtgttgtg ttgtgagaa ttgcagagtg tagtttcggg attaacaga ggcatttgtg 1920
 cagctgttga tgaattagaa agagctgaag tggctgctaa agaacctgaa actgctgggg 1980
 gaccggttga ttttaacgat gatcttgata agcttcaagg gaattggagg ctgttgtata 2040
 gtatgtcgtt ctcttctcgg tctttcgggt gttagccgtc tggcttacct actggacgtt 2100
 tgatccctgt tactcttggc caggtaatte ttgaatcatt gctctgtttt taccctgcaa 2160
 gattcgggtt tccgggttaa ttgttgagg gtttatgtgc atggctctagt ctatctctaa 2220
 tagtcttget tgaatttgaa tggggttgag ctgaatctt agctttctga ggttacaatt 2280
 tggtaantgt atcttatact cgaagcaca ctcttctca tatgtcagg tttatgtgta 2340
 cggctctggc tatcattggt agtctctgtt gagcttgaat ggtgaggagc ttgaatctca 2400
 gcaatgtcat ctactctta atcattcttt tctatattgc caagttctat tgaacgtctt 2460
 tagtcaatca tcttctctct tggcttggtt tgaatgggtg tgaacttaga atctagcttt 2520
 ccttgggtta anttggcaa agaccctac ctgaatcggc agaaagcaca ctctcttaat 2580
 attatctctt gttctctgaat cattaaacaa ggtgtttcaa cggattgatg tgtttagcaa 2640
 agattctgat aacatagcag aggtggaaat agggacccct tggccatttc cgtcattaga 2700
 agccactgcy acattggcac acagtttga actcttaggt ttgcattctc ctctctctca 2760
 ttaagcttat cgaattgtgt aagagcaaaa taacttatct gtatcttga cattctatgg 2820
 gaaacaggc acttgcaaga tcaagatac atttgagaa acaactgtga agacatcggg 2880
 aaacttgtcy cagattcttc gttttagat cccgaggttt cccgacaggt tcagaccatc 2940
 gtcaaacctt ggaactgggg atttogaagt tacttatgtt gatgatacca tgcgcataac 3000
 tccgggggac aggggtgaac ttgggtcatt cgtcattgct taattctcaa agctttgaca 3060
 tgaagagata aataaatact ttctgcttga tgcagctctca tgaattttgt acaaatcatg 3120
 tgaactata atgogctctt aaagtaaat gagtgtcttg ttcaatgaat catatgaag 3180
 aattgtatg actcagaaa ttggacaaag atatagacct tccaaatttt gcacctctca 3240
 atgtgagata ttatgtattt tttcttaggt tggtagagag aacggatttg caaaaaata 3300
 tcaaggtca atgattaca gcaaaacct atcttgatga tccaaatat agagttaca 3360
 agcaagatg agcaatctt atcagagaga gctaaacaa atggattcca aatccagcaa 3420
 gtcaaaaat cgcagaaat aagtgaaa cacttcaa cagagatgtt ccttttccct 3480
 tcttgtacc accgatctcg aatgtctgc acctctgaa taacacaaa accaacaaa 3540
 tgaagcaaa ttaccaagt accaatccgg tataatgaac tgatctatgt tctatgcac 3600
 ttgataggac gctgcagaaa gtgcttgcag ctctgacact gaagctctca acaatcttc 3660
 ttctgtgtct tagctgtta acaagattca caagatgtat cttagtcaa aactgagact 3720
 actggaatgt ctgtttcttc acagctcact tccaaatttc tactakaaat ggttctctaa 3780
 aactacctca ttttaactaa ctagacctaa ttcnaactga aaacacac aatgcattgat 3840
 aatcaatgtt acctttttgt ggaagacagg cttagctctga ccaacataac cagattgttt 3900
 accgtctaaa cgaagcttct cttagagagc aagactgtct ttaacctctt tgaattgggt 3960
 aaactctoc aaatatact ttttcaatc ctatctctca caaataat tcttctctct 4020

Otro ejemplo de un receptor de acuerdo con el presente invento es el encontrado en arroz, el cual contiene una secuencia de aminoácidos parcial de SEQ.ID. No. 4 siguiente:

Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Val	Lys	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Asn	1	5	10	15
Arg	Gly	Leu	Ala	Gly	Ser	Gln	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	20	25	30	
Ala	Arg	Glu	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Glu	35	40	45	
Arg	Asp	Val	Asp	Lys	Leu	Gln	Gly	Arg	Trp	Arg	Leu	Val	Tyr	Ser	Ser	50	55	60	
Ala	Phe	Ser	Ser	Arg	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Arg	Pro	Gly	Pro	Pro	Thr	65	70	75	80
Gly	Arg	Leu	Leu	Pro	Ile	Thr	Leu	Gly	Gln	Val	Phe	Gln	Arg	Ile	Asp	85	90	95	
Val	Val	Ser	Lys	Asp	Phe	Asp	Asn	Ile	Val	Asp	Val	Glu	Leu	Gly	Ala	100	105	110	
Pro	Trp	Pro	Leu	Pro	Pro	Val	Glu	Leu	Thr	Ala	Thr	Leu	Ala	His	Lys	115	120	125	
Phe	Glu	Ile	Ile	Gly	Thr	Ser	Ser	Ile	Lys	Ile	Thr	Phe	Asp	Lys	Thr	130	135	140	
Thr	Val	Lys	Thr	Lys	Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Leu	Pro	Pro	Leu	Glu	Val	145	150	155	160
Pro	Arg	Ile	Pro	Asp	Asn	Leu	Arg	Pro	Pro	Ser	Asn	Thr	Gly	Ser	Gly	165	170	175	
Glu	Phe	Glu	Val	Thr	Tyr	Leu	Asp	Gly	Asp	Thr	Arg	Ile	Thr	Arg	Gly	180	185	190	
Asp	Arg	Gly	Glu	Leu	Arg	Val	Phe	Val	Ile	Ser						195	200		

La proteína conocida como R6p, está codificada por una molécula de ADNc la cual tiene una secuencia parcial que corresponde a la SEQ.ID. No. 5 siguiente:

cgtggctg	ctcaaagt	ca agcttctg	ag cgcgggtg	tcc gggctga	aacc gcggcctc	gc 60
ggggagcc	gaggatct	tg accgcgcc	ga cgcggcgg	cg gggagctc	g aggcggcgg	120
gggtggcg	cccgtcg	acc tggagagg	ga cgtggaca	ag ctgcaggg	gc ggtggagg	180
ggtgtac	agcgcgtt	ct cgtcgcgg	ac gctcggcg	gc agccgccc	cg gcccgccc	240
cggcgcct	ctccccat	ca ccctcggg	ca ggtgtttc	ag aggatcga	tg ttgtcagc	300
ggacttcg	aacatcgt	cg atgtcgag	ct cggcgcg	cca tggccgct	gc cgcgggtg	360
gctgacgg	accctgg	ctc acaagttt	ga gatcatcg	gc acctcgag	ca taaagatc	420
attcgaca	ag acgacgg	tga agacgaag	gg gaacctgt	cc cagctgcc	gc cgctggag	480
ccctcgca	tc cgggaca	acc tccggccg	cc gtccaac	acc ggcagcgg	cg agttcgag	540
gacctacc	tc gacggcg	aca ccgcat	ca cgcgggg	ac agagggg	agc tcaggggt	600

Los inductores de respuesta hipersensible reconocidos por los receptores del presente invento son capaces de inducir necrosis local en tejido vegetal contactado por el inductor.

Ejemplos de fuentes bacterianas adecuadas de polipéptidos o proteínas inductoras de la respuesta hipersensible incluyen especies de *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (las siguientes bacterias: *Erwinia amylovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas solanacearum*, *Xanthomonas campestris* y sus mezclas).

Un ejemplo de una fuente de una proteína o un polipéptido de un hongo inductor de una respuesta hipersensible es *Phytophthora*. Las especies adecuadas de *Phytophthora* incluyen *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora megasperma* y *Phytophthora citrophthora*.

El polipéptido o proteína inductora de la respuesta hipersensible de *Erwinia chrysanthemi* se menciona en la patente de Estados Unidos No. 5,850,015 y la patente de EU No. 6,001,959 las cuales se incorporan aquí por referencia. Esta proteína o polipéptido inductor tiene un peso molecular de 34 kDa, es termoestable, tiene un contenido de glicina mayor del 16% y substancialmente no contiene cisteína.

La proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible derivada de *Erwinia amylovora* tiene un peso molecular aproximado de 39 kDa, tiene un pI (punto isoeléctrico) de aproximadamente 4.3, y es termoestable a 100 °C al menos por 10 minutos. Esta proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible tiene un contenido de glicina mayor del 21% y substancialmente no contiene cisteína. La proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible derivada de *Erwinia amylovora* está mas comúnmente descrito en la patente de EU No. 5,849,868 de Beer y Wei, Z.-M., y colaboradores "Harpin, inductor de la respuesta hipersensible producida por el fitopatógeno *Erwinia amylovora*", Science 257:85-88 (1992), el cual está incorporado aquí por referencia.

La proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible derivada de *Pseudomonas syringae* tiene un peso molecular de 34-35 Kda. Es rico en glicina (cerca del 13.5%) y no posee cisteína ni tirosina. Mayor información acerca de la proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible derivada de *Pseudomonas syringae* y su molécula de ADN codificadora se encuentra en las patentes de EU Nos. 5.708,139 y 5,858,786 y He y colaboradores, "Harpin PSS de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: Una proteína que es secretada a través de la vía Hrp e induce Respuesta Hipersensible en plantas" Cell 73:1255-66 (1993), la cual es incorporada aquí por referencia.

La proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible derivada de *Pseudomonas solanacearum* se

menciona en Arlat, M., F. Van Gijsegem, J. C. Huet, J. C. Pemollet y C.A. Boucher, "Pop´Al, una proteína que induce una respuesta similar a hipersensibilidad en genotipos específicos de petunia, es secretada a través de la vía Hrp de *Pseudomonas solanacearum* EMBO J. 13:543-533 (1994) la cual es incorporada aquí por referencia. Esta proteína tiene 344 aminoácidos, un peso molecular de 33.2 kDa y un pI de 4.16, es termoestable y rica en glicina (20%).

La proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible derivada de *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* tiene una secuencia de aminoácidos parcial que corresponde a la SEQ. ID. No. 6 siguiente:

Thr	Leu	Ile	Glu	Leu	Met	Ile	Val	Val	Ala	Ile	Ile	Ala	Ile	Leu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Ile	Ala	Leu	Pro	Ala	Tyr	Gln	Asp	Tyr						
			20					25							

Esta secuencia es una secuencia aminoterminal que tiene solo 26 residuos de la proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible derivada de *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. Esta cuadra con subunidades de proteínas fimbriales determinadas en otros patovares de *Xanthomonas campestris*.

La proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible derivada de *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* es termoestable, sensible a la proteasa y tiene un peso molecular de 20 kDa. Tiene la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. No. 7 siguiente:

32

Met	Asp	Ser	Ile	Gly	Asn	Asn	Phe	Ser	Asn	Ile	Gly	Asn	Leu	Gln	Thr
1				5					10					15	
Met	Gly	Ile	Gly	Pro	Gln	Gln	His	Glu	Asp	Ser	Ser	Gln	Gln	Ser	Pro
			20					25					30		
Ser	Ala	Gly	Ser	Glu	Gln	Gln	Leu	Asp	Gln	Leu	Leu	Ala	Met	Phe	Ile
		35					40					45			

Met	Met	Met	Leu	Gln	Gln	Ser	Gln	Gly	Ser	Asp	Ala	Asn	Gln	Glu	Cys
	50					55					60				
Gly	Asn	Glu	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Gln	Gln	Glu	Gly	Leu	Ser	Pro	Leu
65					70					75				80	
Thr	Gln	Met	Leu	Met	Gln	Ile	Val	Met	Gln	Leu	Met	Gln	Asn	Gln	Gly
				85					90					95	
Gly	Ala	Gly	Met	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Asn	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly
			100					105					110		

Asn Ala

Esta secuencia de aminoácidos codificada por la
 secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID. No. 8 es la
 siguiente:

```

atggactcta tcggaacaa cttttcgaa atcggcaacc tgcagacgat gggcatcggg 60
cctcagcaac acgaggactc cagccagcag tcgccttcgg ctgggtccga gcagcagctg 120
gatcagttgc tcgccatggt catcatgatg atgctgcaac agagccaggg cagcgatgca 180
aatcaggagt gtggcaacga acaaccgcag aacgggtcaac aggaaggcct gagtccgttg 240
acgcagatgc tgatgcagat cgtgatgcag ctgatgcaga accagggcgg cgccggcatg 300
ggcgggtggcg gttcgggtcaa cagcagcctg ggcggcaacg cc 342
  
```

El aislamiento de la proteína o polipéptido
 inductor de la respuesta hipersensible derivada de
Erwinia carotovora está descrito en Cui y colaboradores
 "Los mutantes RsmA de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*
 Cepa Ecc71, sobre expresan *hrp* Necc e inducen una
 reacción parecida a la hipersensible en hojas de tabaco"
 MPMI, 9 (7):565-73 (1996), la cual se incorpora por
 referencia. Esta proteína tiene 356 aminoácidos, un peso

molecular de 35.6 kDa, y un pI de 5.82 y es termoestable y rica en glicina (21.3%).

La proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible derivada de *Erwinia stewartii* se menciona en Ahmad y colaboradores, "Harpin no es necesaria para la patogenicidad de *Erwinia stewartii* en Maíz" Ann. Mtg. Am. Phytopath. Soc., Julio 27-31, 1996, la cual se incorpora por referencia.

La proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible derivada de *Phytophthora parasitica*, *phytophthora cryptogea*, *Phytophthora cinnamoni*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora megasperma* y *Phytophthora citrophthora* están descritos en Kaman y colaboradores, "Inductores proteicos extracelulares de *Phytophthora*: Mayor especificidad e inducción de resistencia a hongos fitopatógenos y bacterianos". Molec. Plant-Microbe Interact., 6 (1):15-25 (1993), Ricci y colaboradores, "Producción diferencial de parasiticeína, un inductor de necrosis y resistencia en tabaco por aislamientos de *Phytophthora parasitica*". Plant Path. 41:298-307 (1992), Baillreul y colaboradores "Un nuevo inductor de la respuesta hipersensible en tabaco: Una glicoproteína fungosa induce muerte celular, expresión de genes de defensa, producción de ácido salicílico e inducción de resistencia sistémica adquirida," Plant J., 8 (4):551-60 (1995), y Bonnet y colaboradores "Resistencia adquirida disparada por inductores en tabaco y otras plantas" Eur. J. Plant Path., 102:181-92 (1996), los cuales son incorporados por referencia. Estos inductores de

respuesta hipersensible de *Phytophthora* son llamados *elicitinas*. Todas las *elicitinas* conocidas tienen 98 aminoácidos y muestran una identidad de secuencia mayor al 66%. Ellas pueden ser clasificadas en dos grupos, las *elicitinas* básicas y las ácidas, basadas en sus propiedades fisicoquímicas. La clasificación también corresponde a diferencias en la capacidad de las *elicitinas* de inducir síntomas parecidos a la respuesta hipersensible (HR). Las *elicitinas* básicas son 100 veces mas efectivas que las acídicas en causar necrosis de hojas de plantas de tabaco.

Los inductores de la respuesta hipersensible de bacterias Gram positivas como *Clavibacter michiganensis* están descritos en WO 99/11133, los cuales están incorporados por referencia.

Los inductores mencionados arriba son ejemplos. Otros inductores pueden identificarse cultivando bacteria u hongos que induzcan una respuesta hipersensible utilizando condiciones bajo las cuales los genes que codifican para el inductor sean expresados. Las preparaciones libres de células de sobrenadantes de cultivos pueden ser analizadas para detección de actividad del inductor (necrosis local) utilizándolos para infiltrar los tejidos vegetales apropiados.

Volviendo de nuevo al receptor del presente invento para los inductores de respuesta hipersensible, los fragmentos de la proteína receptora están abarcados por el método del presente invento. Además, los fragmentos

de la proteína receptora de longitud total de otras plantas, también pueden ser utilizados.

Los fragmentos adecuados pueden ser producidos por varios medios. En el primero, los subclones del gen que codifica la proteína receptora conocida son producidos por manipulación genética molecular convencional por subclonación de los fragmentos del gen. Los subclones son entonces expresados *in vitro* o *in vivo* en células bacterianas para producir una proteína mas pequeña o péptido que puede ser analizado para una actividad receptora de acuerdo con el procedimiento descrito arriba.

Como una alternativa, los fragmentos de la proteína receptora pueden ser producidas por la digestión de la proteína receptora de tamaño total con enzimas proteolíticas como quimiotripsina o proteinasa A de *Staphylococcus*, o tripsina. Las diferentes enzimas proteolíticas probablemente clivarán las proteínas receptoras en diferentes sitios basados en la secuencia de aminoácidos de la proteína receptora. Algunos de los fragmentos que resultan de la proteólisis pueden ser receptores activos.

En otro enfoque, basados en el conocimiento de la estructura primaria de la proteína receptora, los fragmentos del gen de la proteína receptora pueden ser sintetizados utilizando la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) junto con series específicas de cebadores escogidos para representar porciones particulares de la proteína. Estos serían entonces

clonados en el vector apropiado para la expresión de el péptido o la proteína truncada.

La síntesis química también puede ser utilizada para hacer los fragmentos adecuados. Dicha síntesis es llevada a cabo utilizando secuencias de aminoácidos conocidas para que el receptor sea producido. Alternativamente, sometiendo el receptor de longitud total a altas temperaturas y presiones producirá fragmentos. Estos fragmentos pueden entonces ser separados por procedimientos convencionales (cromatografía, electroforesis -SDS-PAGE-).

Las variantes pueden ser hechas, por ejemplo, por delección o adición de aminoácidos que tienen influencia mínima en las propiedades, estructura secundaria, y naturaleza hidropática del polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido puede ser conjugado a una secuencia señal (o líder) en el N-terminal de la proteína que co-traducciona o pos-traduccionalmente dirige la transferencia de la proteína. El polipéptido puede también ser conjugado a una etiqueta u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido.

Las moléculas de ADN adecuadas son aquellas que hibridan a la molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de 50 bases continuas de la SEQ. ID. No. 2 bajo condiciones astringentes caracterizadas por un amortiguador de hibridación que contiene 0.9 M de citrato de sodio ("SSC) a una temperatura de 37 °C y permanece unida cuando se somete a lavado con el amortiguador SSC a

37 °C; y preferiblemente en un amortiguador de hibridación que comprende 20% de formamida en 0.9M de solución salina/0.09M amortiguador SSC a una temperatura de 42 °C y permanece unido cuando se somete a lavado a 42 °C con 0.2X amortiguador SSC a 42 °C.

El receptor del presente invento es preferiblemente producido en forma purificada (preferiblemente al menos un 60%, mas preferiblemente 80% pura) por técnicas convencionales. Típicamente el receptor del presente invento es producido pero no secretado dentro del medio de crecimiento de las células hospederas recombinantes. Alternativamente, la proteína receptora del presente invento es secretada en el medio de crecimiento. En el caso de proteína no secretada, para aislar la proteína receptora, la célula hospedera (*E. Coli*) que carga el plásmido recombinante es propagada, lisada por sonicación o tratamiento químico y el homogenizado es centrifugado para remover el residuo bacteriano. El lisado puede ser posteriormente purificado por procedimientos convencionalmente utilizados en cromatografía (filtración en gel en dextrán del tamaño apropiado o en una columna de poliacrilamida para separar la proteína receptora). Si es necesario, la fracción protéica puede ser posteriormente purificada por intercambio de iones o HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución).

La molécula de ADN que codifica la proteína receptora puede ser incorporada en células utilizando tecnología convencional de ADN recombinante. Generalmente, esto incluye la inserción de la molécula de

37

ADN en un sistema de expresión en el cual la molécula de ADN es heteróloga (no está normalmente presente). La molécula de ADN heteróloga es insertada en el sistema de expresión o vector en la orientación con sentido y en el cuadro de lectura correcto. El vector contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de las secuencias insertadas codificadoras de la proteína.

La patente de EU No. 4,237,224 de Cohen y Boyer, la cual es incorporada por referencia, describe la producción de sistemas de expresión en forma de plásmidos recombinantes utilizando clivaje por enzimas de restricción y ligación con ADN ligasa. Estos plásmidos recombinantes son entonces introducidos por medio de transformación y replicados en cultivos unicelulares incluyendo organismos procariontes y células eucarióticas crecidas en cultivo de tejidos.

Los genes recombinantes también pueden ser introducidos en virus, como el virus Vaccina. Los virus recombinantes pueden ser generados por transfección de plásmidos en células infectadas con virus.

Los vectores adecuados incluyen pero no están limitados a los siguientes vectores virales como sistema de vector lambda gt11, gt WES.tb, Charon 4 y vectores plasmídicos como pBR322, pBR325, pACYC177, pACYC1084, pUC8, pUC9, pUC18, pUC19, pLG339, pR290, pKC37, pKC101, SV40, pBluescript II SK +/- o KS +/- (vea el catálogo "Stratagene Cloning Systems" (1993) de Stratagene, La Jolla, California que se incorpora aquí por referencia),

pQE, pIH821, pGEX, series pET (vea F.W. Studier y colaboradores "Uso de ARN Polimerasa T7 para expresión directa de genes clonados" Tecnología de expresión de genes vol. 185 (1990), el cual es incorporado por referencia), y cualquiera de sus derivados. Las moléculas recombinantes pueden ser introducidas en células a través de transformación, trasducción, conjugación, movilización o electroporación. Las secuencias de ADN son clonadas en el vector utilizando procedimientos de clonaje estándar como se describe en Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A laboratory Manual. Laboratorio Cold Springs, Cold Springs Harbor, New York (1989), el cual se incorpora aquí por referencia.

Una variedad de sistemas hospedero-vector pueden ser utilizados para expresar las secuencias codificadoras de la proteína. Primariamente, el sistema vector debe ser compatible con la célula hospedera usada. Los sistemas hospedero-vector incluyen pero no están limitados a los siguientes: bacterias transformadas con bacteriófago ADN, ADN plasmídico o cósmido ADN; microorganismos como levaduras que contienen vectores de levaduras, sistemas de células de mamíferos infectados con virus (baculovirus) y células vegetales infectadas por bacterias. Los elementos de expresión de éstos vectores varían en sus fortalezas y especificidades. Dependiendo del sistema hospedero-vector utilizado, cualquiera de los elementos adecuados de transcripción y traducción pueden ser utilizados.

Las diferentes señales genéticas y eventos de proceso controlan muchos niveles de expresión genética (transcripción de ADN y traducción del ARN (ARN mensajero)).

La transcripción del ADN depende de la presencia de un promotor el cual es una secuencia de ADN que dirige la unión de la ARN polimerasa y por lo tanto promueve la síntesis de ARNm. Las secuencias de ADN de promotores eucarióticos difieren de los promotores procarióticos. Adicionalmente, los promotores eucarióticos y las señales genéticas acompañantes pueden no ser reconocidas o pueden no funcionar en un sistema procariótico y los promotores procarióticos no son reconocidos y no funcionan en células eucarióticas.

Similarmente la traducción de ARNm en procariotas depende de la presencia de señales procariotas apropiados que difieren de los eucariotas. La traducción eficiente de ARNm en procariotas requieren un lugar de unión del ribosoma llamado secuencia Shine-Dalgarno ("SD") en el ARNm. Esta secuencia es una secuencia corta de nucleótidos del ARNm que está localizada antes del codón de iniciación, usualmente AUG, que codifica la metionina amino-terminal de la proteína. La secuencia SD es complementaria al final 3' del rARN 16S (ARN ribosomal) y probablemente promueve la unión del ARNm a los ribosomas uniéndose con el ARNr para permitir el posicionamiento correcto del ribosoma. Para una revisión, vea Roberts y Lauer, Métodos en Enzimología, 68:473 (1979), la cual es incorporada por referencia.

41

Los promotores varían en su "fuerza" (su capacidad de promover la transcripción). Para los propósitos de expresar un gen clonado, es deseable utilizar promotores fuertes para obtener un nivel alto de transcripción y por consiguiente, la expresión del gen. Dependiendo del sistema de célula hospedera utilizada, cualquiera de los promotores adecuados puede ser utilizado. Por ejemplo, cuando se clona en *E. Coli*, sus bacteriófagos, o plásmidos o promotores como el promotor de fago T7, promotor lac, promotor trp, promotor recA, promotor ARN ribosomal, los promotores Pr y Pl de colifago lambda y otros, incluyendo pero no limitados a lacUV5, ompF, bla, lpp y similares, pueden ser utilizados para dirigir niveles altos de transcripción de segmentos de ADN adyacentes. Adicionalmente, un promotor híbrido trp-lacUV5 (tac) u otros promotores de *E. Coli* producidos por ADN recombinante u otras técnicas sintéticas de ADN pueden ser utilizadas para la transcripción del gen insertado.

Las cepas bacterianas hospederas y los vectores de expresión pueden ser escogidos para que inhiban la acción del promotor a menos que sean específicamente inducidos. En algunas operaciones, la adición de inductores específicos es necesaria para la transcripción eficiente del ADN insertado. Por ejemplo el operon lac es inducido por la adición de lactosa o IPTG (isopropiltio-beta-D-galactoside). Una variedad de otros operones, como trp, pro, etc, están bajo controles diferentes.

Las señales de iniciación específica también se requieren para una transcripción y traducción específica en células procariotas. Estas señales de iniciación de transcripción y traducción pueden variar en "fuerza" medidas por la cantidad de ARN mensajero específico y proteína sintetizada, respectivamente. El vector de expresión de ADN que contiene el promotor, pueden también contener cualquier combinación de varias señales "fuertes" de transcripción y/o traducción. Por ejemplo, la traducción eficiente de *E. Coli* requiere una secuencia SD de 7-9 bases en el extremo 5' del codón de iniciación ("ATG") para proveer un sitio de unión al ribosoma. Entonces, cualquier combinación SD-ATG que pueda ser utilizada por los ribosomas de la célula hospedera, puede ser empleada. Dichas combinaciones incluyen pero no están limitadas a la combinación SD-ATG del gen *cro* o del gen *N* del colifago *lambda* o de los genes *trp* *E*, *D*, *C*, *B* o *A* de *E. Coli*. Adicionalmente, cualquier combinación SD-ATG producida por ADN recombinante u otras técnicas incluyendo la incorporación de nucleótidos sintéticos puede ser utilizado.

Una vez la molécula de ADN aislada que codifica la proteína receptora ha sido clonada en un sistema de expresión, está lista para ser incorporada en una célula hospedera. Esta incorporación puede ser llevada a cabo por las varias formas de transformación notadas arriba, dependiendo del sistema de vector-hospedero. Las células hospederas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a.

bacteria, virus, levaduras, células de mamíferos, insectos, plantas y similares.

Un aspecto del presente invento involucra el aumento de la receptividad de la planta al tratamiento con el inductor de la respuesta hipersensible proveído por una planta transgénica o semilla de una planta transgénica, transformada con una molécula de ácido nucleico codificadora de una proteína receptora de un inductor de respuesta hipersensible. Se ha encontrado que los inductores de respuesta hipersensible son útiles en impartir resistencia a enfermedades en plantas, aumentar el crecimiento de la planta, control de insectos o impartir el stress por resistencia en una variedad de plantas. En vista del receptor de la interacción del presente invento con los inductores, se espera que éstos efectos benéficos serían aumentados llevando a cabo dichos tratamientos con el inductor con plantas transformadas con el gen que codifica el receptor del presente invento.

Las plantas transgénicas que contienen el gen que codifica el receptor de acuerdo con el presente invento puede prepararse de acuerdo a técnicas bien conocidas.

Un vector que contenga el gen codificador del receptor descrito arriba puede ser microinyectado directamente en células vegetales con el uso de micropipetas para transferir mecánicamente el ADN recombinante. Crossway, Mol. Gen. Genetics, 202:179-85 (1985), el cual es incorporado por referencia. El material genético puede también ser transferido en la

44
célula vegetal utilizando polietilén glicol. Krens, y colaboradores, Nature, 296:72-74 (1982), el cual es incorporado aquí por referencia.

Otra aproximación para transformar células vegetales con un gen es el bombardeo de partículas (también conocido como transformación biolística) de la célula hospedera. Esto puede ser llevado a cabo de varias maneras. La primera involucra el impulsar partículas inertes o biológicamente activas a las células. Esta técnica se encuentra en las patentes de EU Nos.

4,945,050, 5,036,006 y 5,100,792 todas de Sanford y colaboradores, que se incorporan aquí por referencia. Generalmente, este procedimiento involucra impulsar partículas inertes o biológicamente activas en las células bajo condiciones efectivas para penetrar la superficie externa de la célula para ser incorporadas dentro del interior de la misma. Cuando son utilizadas partículas inertes, el vector puede ser introducido en la célula cubriendo las partículas con el vector que contenga el ADN heterólogo. Alternativamente, la célula blanco puede rodearse por el vector para que éste sea transportado dentro de la célula por la partícula. Partículas biológicamente activas (células bacterianas secas que contengan el vector y ADN heterólogo) pueden también ser introducidas en células vegetales.

Otro método de introducción es la fusión de protoplastos con otras entidades, ya sea minicélulas, células, lisosomas u otros cuerpos fundibles cubiertos de lípidos. Fraley y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci.

40

USA, 79:1859-63 (1982) el cual es incorporado por referencia.

La molécula de ADN puede ser también introducida en las células vegetales por electroporación. Fromm y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5824 (1985), que es incorporado por referencia. En ésta técnica, los protoplastos vegetales son electroporados en presencia de plásmidos que contengan el cassette de expresión. Los impulsos eléctricos de alto campo de fuerza permeabilizan reversiblemente biomembranas permitiendo la introducción de plásmidos. Los protoplastos de plantas electroporadas reforman la pared celular, se dividen y regeneran.

Otro método para introducir la molécula de ADN en células vegetales es infectar una célula vegetal con *Agrobacterium tumefaciens* o *A. Rhizogenes* previamente transformados con el gen. Bajo condiciones apropiadas, las células vegetales transformadas se cultivan para formar brotes o raíces, y se desarrollan posteriormente en plantas. Generalmente, éste procedimiento involucra inocular el tejido de la planta con una suspensión de bacteria y una incubación del tejido por 48 a 72 horas en medio de regeneración sin antibióticos a 25-28 °C.

El *Agrobacterium* es un género representativo de la familia Gram-negativa Rhizobiaceae. Sus especies son responsables de la agalla de la corona (*A. Tumefaciens*) y enfermedad de raicillas (*A. Rizogenes*). Las células vegetales en tumores de agalla de la corona y raicillas son inducidas para producir derivados de aminoácidos llamados opinas, que son catabolizados solo por la

45

41

bacteria. Los genes bacterianos responsables de la expresión de opinas son una fuente conveniente de elementos de control para cassettes de expresión quimérica. Además el análisis de presencia de opinas puede ser usado para identificar tejido transformado.

Las secuencias genéticas heterólogas pueden ser introducidas en las células vegetales apropiadas, por medio del plásmido Ti de *A. Tumefaciens* o Ri de *A. Rhizogenes*. El plásmido Ti o Ri es transmitido a células vegetales por la infección del *Agrobacterium* y es establemente integrado dentro del genoma de la planta. J. Schell, Science, 237:1176-83 (1987) incorporado por referencia.

Luego de la transformación, las células vegetales transformadas deben ser regeneradas.

La regeneración vegetal de protoplastos cultivados se describe en Evans y colaboradores, Handbook of Plant Cell Cultures. Vol 1: (MacMillan Publishing Col. New York 1983) y Vasil I.R. (ed), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Acad. Press, Orlando, Vol I, 1984, and Vol III (1986), incorporados por referencia.

Se sabe que prácticamente todas las plantas pueden ser regeneradas de células cultivadas o tejidos, incluyendo pero no limitadas a todas las especies mayores de caña de azúcar, remolacha azucarera, algodón, árboles frutales y legumbres.

Los medios de regeneración varían de especie a especie de planta, pero generalmente una suspensión de protoplastos transformados o una caja de petri que

47

contenga explantes transformados debe proveerse. El tejido de Callo es formado y los brotes pueden ser inducidos del callo y subsecuentemente enraizados. Alternativamente, la formación de embrión puede ser inducida en el tejido del callo. Estos embriones germinan como embriones naturales para formar plantas. El medio de cultivo generalmente contendrá varios aminoácidos y hormonas como auxina y citokininas. Es también ventajoso añadir ácido glutámico y prolina al medio especialmente para especies como maiz y alfalfa. La regeneración eficiente dependerá del medio, del genotipo y de la historia del cultivo. Si éstas tres variables están controladas, entonces la regeneración es usualmente reproducible y repetible.

Luego que el cassette de expresión es establemente incorporado en las plantas transgénicas, puede ser transferido a otras plantas por cruces sexuales. Cualquiera de las técnicas estándar de mejoramiento pueden ser utilizadas dependiendo de las especies a ser cruzadas.

Una vez las plantas transgénicas de éste tipo son producidas, las plantas mismas pueden ser cultivadas de acuerdo con procedimientos convencionales. Alternativamente, las semillas transgénicas o propágulos (cortes) son recobradas de las plantas transgénicas. Las semillas pueden ser plantadas en el suelo y cultivadas utilizando procedimientos convencionales para producir plantas transgénicas. Las plantas transgénicas son propagadas de las semillas transgénicas plantadas.

43

X
48

Estos métodos de tratamiento del inductor pueden involucrar aplicar la proteína o el polipéptido inductor de la respuesta hipersensible en una forma no infecciosa a una parte o toda la planta o semilla de la planta transformada con el gen receptor de acuerdo con el presente invento bajo condiciones efectivas para el inductor para impartir resistencia a enfermedades, aumentar crecimiento, controlar insectos y/o impartir resistencia al stress. Alternativamente, la proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible puede ser aplicada a las plantas cuyas semillas recuperadas de éstas plantas son capaces de impartir resistencia a enfermedades en plantas, aumentar el crecimiento de la planta, controlar el efecto de los insectos y/o impartir la resistencia al stress.

Como alternativa a la aplicación del polipéptido o proteína inductora de la respuesta hipersensible a plantas o semillas de plantas para impartir resistencia a enfermedades en plantas, incidir en el crecimiento de las plantas, controlar insectos, y/o impartir resistencia al stress en las plantas o plantas crecidas de semillas, plantas transgénicas o semillas de plantas pueden ser utilizadas. Cuando se utilicen plantas transgénicas, involucra proveer de una planta transgénica transformada con una molécula de ADN que codifique un receptor de acuerdo con el presente invento y con una molécula de ADN que codifique una proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible. La planta se cultiva bajo condiciones efectivas para permitir que las moléculas de

ADN impartan resistencia a enfermedades en plantas, aumenten el crecimiento de la planta, controlen insectos, y/o impartan resistencia al stress. Alternativamente, una semilla de planta transgénica transformada con una molécula que codifique un polipéptido o proteína que induzca una respuesta hipersensible y una molécula de ADN que codifique un receptor puede ser proveída y plantada en el suelo. La planta es entonces propagada de la semilla plantada bajo condiciones efectivas para permitir a las moléculas de ADN de impartir resistencia a enfermedades en plantas, aumentar el crecimiento de la planta, controlar insectos, y/o impartir resistencia al stress.

La forma en la cual la proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible es aplicada a la planta o semillas de la planta puede ser llevada a cabo en un número de formas incluyendo: 1) Aplicación de un inductor aislado o 2) aplicación de una bacteria que no cause enfermedad y esté transformada con el gen que codifique el inductor. En la última forma el inductor puede ser aplicado a plantas o semillas de plantas aplicando bacterias que contienen la molécula de ADN que codifique la proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible. Esta bacteria debe ser capaz de secretar o exportar el inductor para que éste pueda contactar la planta o las células de la semilla de la planta. De ésta forma el inductor es producido por la bacteria in planta o en semillas o justo antes a la

49

45

introducción de la bacteria a las plantas o las semillas de la planta.

El tratamiento con el inductor de la respuesta hipersensible puede ser utilizado para tratar una amplia variedad de plantas o sus semillas para impartir resistencia a enfermedades en plantas, aumentar el crecimiento de la planta, controlar insectos, y/o impartir resistencia al stress. Las plantas adecuadas incluyen dicotiledóneas y monocotiledóneas. Mas particularmente, las plantas cultivables útiles pueden incluir: alfalfa, arroz, trigo, cebada, centeno, algodón, girasol, maní, maiz, papa, papa dulce, frijol, arveja, achicoria, lechuga, endibia, col, coles de bruselas, remolacha, chirivía, nabo, coliflor, brócoli, rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimienta, apio, zanahoria, calabaza, zucchini, zapallo, cohombro, manzana, pera, melón, cítricos, fresa, uva, frambuesa, piña, soya, tabaco, tomate, sorgo y caña de azúcar. Ejemplos de plantas ornamentales adecuadas son: Arabidopsis thaliana, Saintpaulia, petunia, pelargonio, ponsettia, crisantemo, clavel y zinnia.

Con respecto al uso de inductores de la respuesta hipersensible en impartir resistencia a enfermedades, la inmunidad absoluta contra la infección puede no ser conferida pero la severidad de la enfermedad es reducida y el desarrollo de síntomas es demorado. El número de lesiones, el tamaño de la lesión, y la cantidad de esporulación de los hongos patógenos están disminuídos. Este método de impartir resistencia a enfermedades tiene

50

46

el potencial de tratar enfermedades intratables previamente, tratar enfermedades sistémicamente que pueden no ser tratadas separadamente debido al costo, y evitar el uso de agentes infecciosos o materiales ambientalmente dañinos.

El método de impartir resistencia de plantas a patógenos es útil en impartir resistencia a una amplia variedad de patógenos incluyendo virus, bacteria y hongos. La resistencia, inter alia, a los siguientes virus puede ser conseguida por el método del presente invento: Virus del mosaico del tabaco y virus del mosaico del tomate. Resistencia, inter alia, a las siguientes bacterias puede también ser impartida a las plantas *Pseudomonas solanacearum*; *Pseudomonas syringae* pv. Tabaci; y *Xanthomonas campestris* pv. Pelargonii. Las plantas pueden hacerse resistentes inter alia a los siguientes hongos: *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*.

Con respecto al uso de la proteína o el polipéptido inductor de la respuesta hipersensible para aumentar el crecimiento de la planta, varias forma de promover o aumentar el crecimiento de la planta pueden ser alcanzadas. Esto puede ocurrir tan temprano como cuando el crecimiento de la planta comienza de semillas o mas tarde en la vida de una planta. Por ejemplo, el crecimiento de la planta de acuerdo con el presente invento abarca mayor producción, cantidad mayor de semillas producidas, incremento en el porcentaje de semillas germinadas, incremento en el tamaño de la

51

47

52

planta, mayor biomasa, mayor y mas grandes frutas, coloración mas temprana de las frutas y frutas y maduración de la planta mas tempranas. Como resultado, existe un beneficio económico significativo para los cultivadores. Por ejemplo, una germinación mas temprana y una maduración mas temprana permite que los cultivos se mantengan en áreas donde las estaciones de crecimiento cortas de otra manera imposibilitan su crecimiento en esa localidad. El porcentaje incrementado de la germinación de la semilla resulta en un mejoramiento del cultivo y un uso mas eficiente de la semilla. Una mayor producción, un tamaño incrementado y una mayor producción de la biomasa permitirán la generación de mayores ingresos de un lote o una tierra dada.

El uso de inductores de respuesta hipersensible para control de insectos abarca la prevención de los insectos de contactar plantas a las cuales el inductor de respuesta hipersensible haya sido aplicado, previniendo el daño directo del insecto en las plantas por heridas por alimentación, causando que los insectos abandonen dichas plantas, maten insectos próximos a dichas plantas, interfiriendo con la alimentación larval en dichas plantas, previniendo que los insectos colonicen las plantas, previniendo que los insectos colonizadores liberen fitotoxinas, etc. El presente invento también previene daños por enfermedad de las plantas que resultan de la infección por insectos.

El tratamiento con el inductor es efectivo contra una amplia variedad de insectos. El barrenador europeo

48

del maiz es una de las mayores plagas del maíz (maíz salado y dulce) y también se alimenta en mas de 200 especies de plantas incluyendo frijoles verdes, cerosos y lima y soya comestible, pimienta, papa y tomate además de una amplia variedad de especies de malezas. Plagas adicionales de alimentación larval que dañan una amplia variedad de cultivos incluyen: gusano de la remolacha, gusano de la col, gusano del maiz, gusano del otoño, polillas, gusano de la raíz de la col, gusano del tomate. Colectivamente, este grupo de insectos plaga representan el grupo económico mas importante de plagas para la producción de vegetales alrededor del mundo.

El tratamiento con el inductor de la respuesta hipersensible es también útil en impartir resistencia a plantas contra stress ambiental. El stress abarca cualquier factor ambiental que tenga un efecto adverso en fisiología de la planta y su desarrollo. Ejemplos de dichos stress ambientales incluyen stress relacionados con el clima (sequedad, agua, congelación, temperaturas frias, temperaturas altas, luz excesiva, e insuficiente luz), stress por polución del aire (dioxido de carbono, monóxido de carbono, dióxido de sulfuro, Nox, hidrocarburos, ozono, radiación ultravioleta y lluvia ácida), químicos (insecticidas, fungicidas, herbicidas, metales pesados) y stress nutricionales (fertilizantes, micronutrientes, macronutrientes).

La aplicación de un polipéptido o proteína inductor de respuesta hipersensible puede ser llevada a cabo a través de una variedad de procedimientos cuando toda o

53

Z
54

parte de la planta es tratada incluyendo hojas, tallos, raíces, etc. Esto puede (pero no necesita) involucrar infiltración de la proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible en la planta. Los métodos de aplicación adecuados incluyen aspersión a alta o baja presión, inyección y abrasión de la hoja próxima a cuando la aplicación ocurre. Cuando se tratan semillas o propágulos (cortes), la proteína o polipéptido inductor de la respuesta hipersensible puede ser aplicada por aspersión a baja o alta presión, cubrimiento, inmersión, o inyección. Otros procedimientos adecuados de aplicación pueden ser visualizados por aquellos con habilidades en el campo dado que sean capaces de efectuar contacto del inductor con las células de la planta o de la semilla de la planta. Una vez tratadas con el inductor de la respuesta hipersensible, las semillas pueden ser plantadas en suelo natural o artificial y cultivadas utilizando procedimientos convencionales para producir plantas. Luego de que las plantas han sido propagadas de semillas tratadas con un inductor, las plantas pueden ser tratadas con una o mas aplicaciones de la proteína o el polipéptido inductor de la respuesta hipersensible para impartir resistencia de las plantas a enfermedades, aumentar el crecimiento de la planta, controlar insectos, y/o impartir resistencia al stress.

El polipéptido o proteína inductor de la respuesta hipersensible puede ser aplicado a plantas o semillas de plantas solo o en mezcla con otros materiales. Alternativamente, el inductor puede ser aplicado

50

separadamente a plantas con otros materiales siendo aplicados en diferentes tiempos.

Una composición adecuada para tratar plantas o semillas de plantas contiene un polipéptido o una proteína inductora de la respuesta hipersensible en un transportador. Los transportadores adecuados incluyen agua, soluciones acuosas, soluciones lechosas, o polvos secos.

Aunque no se requiere, ésta composición puede contener aditivos adicionales incluyendo fertilizantes, insecticidas, fungicidas, nematocidas y mezclas. Los fertilizantes adecuados incluyen $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$. Un ejemplo de insecticida adecuado es el Malation. Los fungicidas útiles incluyen Captan.

Otros aditivos adecuados incluyen agentes amortiguadores, agentes humectantes, agentes cubridores y agentes escoriadores. Además, el inductor de la respuesta hipersensible puede ser aplicado a las semillas de las plantas con otra formulación convencional para semillas y materiales de tratamiento, incluyendo arcillas y polisacáridos.

En la técnica alterna involucrando el uso de plantas transgénicas y semillas de plantas transgénicas que codifican el gen de inductor de respuesta, un inductor de respuesta hipersensible no necesita ser aplicado tópicamente a las plantas o las semillas. Por el contrario, las plantas transgénicas transformadas con una molécula de ADN que codifica el inductor son producidas

55

51

de acuerdo con procedimientos bien conocidos como se describe arriba.

En otro aspecto, el presente invento se relaciona con una construcción la cual es una molécula de ácido nucleico contra-sentido de una molécula de ácido nucleico codificadora de un receptor en plantas para los inductores de respuesta hipersensible a patógenos. Un ejemplo de ésta construcción sería una molécula de ADN contrasentido de una molécula de ADN que contenga la secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID. Nos. 2 o 3. Alternativamente, la construcción de ADN puede tener una molécula de ADN que tenga la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID. Nos. 2 o 3 (o una porción) y su cadena complementaria y es usada para generar un solo transcrito con una repetición invertida (doble cadena) de ARN. Este transcrito al igual que la antes discutida molécula de ácido nucleico contra-sentido pueden ser utilizadas para inducir el silenciamiento de la molécula de ácido nucleico codificadora de un receptor para un inductor de la respuesta hipersensible.

La detección del inductor de la respuesta hipersensible por el receptor es el primer paso de la vía de transducción de la señal en plantas que eventualmente llevarán a la resistencia de enfermedades, aumento del crecimiento, control de insectos y resistencia al stress. Silenciar al receptor provee una herramienta útil para encontrar y estudiar los componentes corriente debajo de ésta vía. Adicionalmente, el receptor puede ser un regulador negativo de dicha vía transducción de la señal.

56

52

El silenciamiento del receptor impartirá a las plantas la habilidad de resistir enfermedades y stress, controlar insectos y aumentar el crecimiento sin el tratamiento del inductor de la respuesta hipersensible.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Materiales y métodos

La técnica de laboratorio utilizada en el ejemplo es el siguiente. Todas las manipulaciones descritas aquí siguieron protocolos convencionales (Sambrook y colaboradores "Clonaje molecular: Un manual de laboratorio" Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Ausubel y colaboradores "Protocolos actuales en biología molecular" John Wiley (1987), los cuales son incorporados aquí por referencia). Los plásmidos y microorganismos descritos aquí, utilizados para hacer el presente invento, fueron obtenidos de fuentes comerciales, o de los autores de publicaciones previas. Las secuencias fueron analizadas con Clone Manager 5 (Software científico y educacional, Durham, Carolina del Norte).

La cepa de levadura L40 se cultivó en YDP o en diferentes medios mínimos sintéticos de selección a 30 °C. Las cepas de E. coli DH5α y HB101 se cultivaron en LB a 37 °C.

El sistema de levadura dos-híbridos se basa en el hecho de que muchos factores de transcripción eucariotas están compuestos de un dominio de unión al ADN (ADN-BD) y un dominio de activación (AD) físicamente separables y

funcionalmente independientes. Tanto ADN-BD como el AD son requeridos para activar un gen. Cuando son físicamente separados por tecnología de ADN recombinante y son expresados en la misma célula hospedera, el ADN-BD y el AD no interactúan directamente uno con otro y entonces no pueden activar el gen correspondiente (Ma y colaboradores "Conversión de un Inhibidor Transcripcional Eucariota en un Activador" Cell 55:443 (1988) y Brent y colaboradores "Un Activador Transcripcional Eucariota portando un represor eucariota" Cell, 43:729 (1985), los cuales son incorporados aquí por referencia). Pero si el ADN-BD y el AD son traídos en una cercanía física próxima en la región promotora, la función de activación transcripcional se restaurará. Por consiguiente, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el sistema dos-híbridos se han convertido en herramientas genéticas esenciales para estudiar interacciones macromoleculares.

En el sistema de dos-híbridos utilizado aquí el ADN-BD codificado por el vector anzuelo pVJL11 (Jullien-Flores, V. "Llevando la GTPasa Ral a las Vías Rho. RLIP76, un efector Ral con actividad de proteína CDC42/Rac activadora de la GTPasa" J. Biol. Chem. 27:22473 (1995), la cual es incorporada aquí por referencia), es la proteína procariota LexA, y el dominio de activación codificado en el vector presa pGAD 10 o pGAD GH (Clontech; Hannon, GJ. "Aislamiento del p130 relacionado con RB a través de su interacción con CDK2 y ciclinas" Genes Dev. 7:2378 (1993), el cual es incorporado aquí por referencia) es derivado de la

58

57

59

proteína de la levadura DAL4. pVJL11 también tiene un marcador TRP1, y un marcador pGAD y LEU2. Una interacción entre la proteína anzuelo (fusionada al ADN-BD) y una proteína codificada por la librería (fusionada al AD) crea un nuevo activador transcripcional con afinidad de unión a los operadores LexA. La levadura hospedera L40 {MATa his3D200 trip1-901, leu2-3, 112 ade2 LYS2: :lexAop)4-HIS3URA3: :lexAop)8-lacZ} carga dos genes reporteros, lacZ e HIS 3, que contienen un sitio de unión de Lex A corriente arriba. El reportero nutricional HIS3 provee una selección de crecimiento selectiva que puede identificar un solo transformante positivo de varios millones de clones candidatos. La expresión de los genes reporteros indica la interacción entre la proteína candidata y la proteína anzuelo. Vea Figura 1.

La proteína harpin de *Erwinia amylovora* fue utilizada como proteína anzuelo para monitorear la librería de ADNc de *Arabidopsis thaliana*, clonada en el vector pGAD10 (Laboratorios Clontech, Inc. Palo Alto, California). Una proteína codificada de la librería del ADNc fue identificada como una proteína que interactuaba fuertemente con la proteína harpin, entonces un posible receptor del harpin. El presente invento reporta la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos deducida de éste ADNc.

Ejemplo 2

HrpN de *Erwinia amylovora* fue sublonada en el vector anzuelo pVJL11 del sistema dos híbridos de levadura. Un

55

L
60

PCR fue llevado a cabo utilizando un fragmento de 1.3 Kb del harpin (Wei y colaboradores "Harpin, inductor de la respuesta hipersensible producida por el fitopatógeno *Erwinia amylovora*" Science 257:85 (1992), el cual es incorporado aquí por referencia) como molde para amplificar la región codificadora de harpin. Un sitio de restricción BamHI fue adicionado a la terminación 5' de la región codificadora y un sitio SalI a la región 3'. Un fragmento de PCR digerido con BamHI y SalI fue ligado al vector anzuelo pVJL11 digerido con las mismas enzimas de restricción. pVJL11 tiene un marcador TRP1 para ser seleccionado en levaduras y un marcador de resistencia a Amp para ser seleccionado en *E. coli*. El plásmido de ADN fue amplificado en la cepa de *E. coli* DH5 α . Cuando se analizó en el sistema de híbridos, con el vector presa pGAD GH y varias proteínas no relacionadas, HrpN no mostró ninguna autoactivación o interacción no específica con proteínas no relacionadas, como se muestra en la figura 2.

Ejemplo 3

HrpN-pVJL11 fue transformado en la cepa de levadura L40 por el método mediado por acetato de Litio (LiAc) (Ito y colaboradores, "Transformación de células de levaduras intactas tratadas con cationes alcali" J. Bacteriol. 153:163 (1983) y Vjtek y colaboradores, "Ras de mamíferos interactúa directamente con la kinasa Serina/Treonina Raf." Cell 74:205 (1993) la cual es incorporada aquí por referencia). La librería de ADNc de

52

X
61

Arabidopsis thaliana MATCHMAKER (Laboratorios Clonetech, Inc. Palo Alto CA) fue monitoreada para la detección de interacción de las proteínas harpin. Aproximadamente 6.8 millones de transformantes primarios de la librería fueron reaislados en placas sin histidina, leucina y triptófano. Un total de 148 colonias crecieron en las placas sin histidina, 55 de las cuales tiñeron como positivas para expresión de B-galactosidasa. Luego de 3 rondas de selección en medio mínimo sintético (SD) en placas sin leucina, triptófano e histidina, y confirmar por la expresión del segundo gen reportero lacZ, utilizando el análisis de B-galactosidasa, 47 colonias parecían ser fuertes candidatas de interacción.

Ejemplo 4

El ADN plasmídico fue extraído de las 47 colonias independientes de levadura e introducidas en la cepa de *E. coli* HB101, que carga la mutación leuB. Por consiguiente, el plásmido presa (ADNc-pGAD10) fue seleccionado en placas con nutrientes mínimos ya que pGAD 10 carga el marcador LEU2.

Los 47 plásmidos presa independientemente rescatados de *E. coli* fueron reanalizados en el sistema de dos-híbridos con la proteína harpin como anzuelo. Estas fueron también analizadas contra proteínas no relacionadas. 25 resultaron como candidatos de interacción, 20 de los cuales fueron fuertes candidatos de interacción específica. Los análisis de secuencia mostraron que los 20 clones de ADNc independientes venían

57

realmente del mismo gen con diferente integridad en la terminación 5'. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas utilizando el kit de reacción de terminación PE Prism Big Dye. El gel de secuenciación fue corrido en Thatagen (Bothell, WA).

Uno de los ocho plásmidos, el cual tenía el inserto de ADNc mas largo de 1kg, fue utilizado para análisis posteriores. Cuando se co-transformó en la cepa de levadura L40, se demostró que era negativa con anzuelo desocupado y con proteínas no relacionadas en el sistema de dos-híbridos, indicando la especificidad de la interacción entre harpin y su receptor candidato. Vea figura 3.

Ejemplo 5

El inserto mas largo de ADNc, HrBP1, fue subclonado en los sitios BamHI y SalI del vector anzuelo pVIJL11. Este constructo no mostró auto-activación de los genes reporteros, o interacción con proteínas no relacionadas en el sistema de dos-híbridos. Sin embargo la expresión de los genes reporteros fue activada cuando L40 fue cotransformada con HrBP1-pVJL11 y HrpN-pGAD GH, indicando la interacción específica entre HrBP1p (la proteína codificada por HrBP1) y harpin. Vea la figura 4.

Ejemplo 6

El ARN total fue extraído de Arabidopsis thaliana de dos semanas de edad utilizando el minikit para plantas QIAGEN Rneasy (Qiagen, Inc., Valencia, California). ARN

62

58

Z
63

Poli A fue posteriormente purificado de ARN total utilizando una columna QIAGEN Oligotex (Qiagen, Inc., Valencia, California). Un Northern Blott fue llevado a cabo utilizando la región traducida de HrBP1 como sonda. Una sola especie con peso molecular aparente de cerca de 1.1 Kb fue detectada de ARN total y ARN Poli A. Por consiguiente, el ADNc mas largo de HrBP2 del monitoreo del sistema dos-híbridos parecía contener el ADNc de longitud total. La integridad del ADNc del extremo 5' fue posteriormente confirmada por un análisis de extensión de cebadores.

Como se describió, un sistema de dos híbridos fue utilizado para monitorear proteínas que interactuaban con harpin. HrpN de *Erwinia amylovora* fue subclonada en el vector anzuelo pVJL11 del sistema de dos-híbridos de levaduras, el cual contiene un marcador TRP1. La proteína fusionada lexA harpin es expresada de esta construcción en levadura. La librería de ADNc de *Arabidopsis thaliana* MATCHMAKER (Laboratorios Clontech, Inc. Palo Alto, CA) fue monitoreada para detección de proteínas que interactuaran con el inductor de la respuesta hipersensible. 6.8 millones de colonias independientes fueron monitoreadas, y HrBP1 fue identificada como una fuerte candidata a la interacción con harpin. HrBP1 fue mapeada en el ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* en el cromosoma 3, clone P1 MLM24 (Nakamura, "Análisis estructural del cromosoma 3 de *Arabidopsis thaliana*" submitido directamente a la base de datos DDBJ/EMBL/GenBank (1998), la cual es incorporada

~~64~~
64

aquí por referencia). Cuatro exones y tres intrones fueron descubiertos (vea figura 5). El exon 4 incluye una región en la terminación 3' con 130 pb (pares de bases) no traducidas. En el marco de lectura abierto desde la primera metionina, se codifica un polipéptido (llamado HrBP1p) de 284 aminoácidos. El peso molecular predicho de HrBP1p es de 30454.3 y su pI (punto Isoeléctrico) de 5.72. No hay aparente dominio transmembranal en éste polipéptido. La herramienta SMART Investigación de arquitectura simple modular (V3.1) predijo los primeros 18 aminoácidos como secuencia señal. La presa con la fusión HrBP1-AD resultó negativa con la presa vacía y con proteínas no relacionadas en el sistema 2-H, indicando la especificidad de la interacción entre harpin y su candidato receptor. Cuando se colocó en la orientación opuesta el HrBP1p fusionado con el ADN-BD y harpin con el AD, todavía interactuaron específicamente uno con el otro.

HrBP1 no tenía una similitud de secuencia significativa con secuencias depositadas en bases de datos mayores con el programa de búsqueda Blast. Por consiguiente HrBP1p es una proteína novedosa.

Ejemplo 7

El ADNc HrBP1 fue subclonado en los sitios NdeI y SalI del vector pET-28⁺ (Novagen, Madison, WI). HrBP1 fue expresado de su vector en E. coli como una proteína etiquetada con His y purificada con NiNTA (QIAGEN Inc. Valencia CA) de acuerdo con el manual proveído por el

70
65

fabricante. Esta proteína recombinante incrementó la capacidad del harpin de inducir HR en plantas de tabaco. La proteína recombinante HrBP1 etiquetada con His fue utilizada para generar anticuerpo anti-HrBP1 para facilitar los estudios bioquímicos y funcionales de HrBP1. Los estudios de localización preliminar utilizando anticuerpo anti HrBP1 en un Western blot mostró que el HrBP1 existe en todas partes en Arabidopsis incluyendo sus hojas, tallos y raíces.

Ejemplo 8

10 µg de ARN total de 14 diferentes especies de plantas fue separado en gel de agarosa al 1% y luego transferido a una membrana Amersham Hybond NX (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey). La sonda de ARN que era complementaria con las bases 651-855 de la región dofiadora de HrBP1 fue generada utilizando el kit Ambion Strip-EZ ARN (Ambion Inc., Houston, Texas), procedimiento seguido según recomendación del fabricante.

La secuencia del fragmento HrBP1 utilizado para generar la sonda Northern (SEQ.ID. No. 9) es como sigue:

```
gatcaagata acatttgaga aaacaactgt gaagacatcg ggaaacttgt cgcagattcc 60
tccgtttgat atcccgaggc ttcccgacag ttccagacca tcgtcaaacc ctggaactgg 120
ggatttcgaa gttacctatg ttgatgatac catgcgcata actcgcgggg acagaggtga 180
acttagggta ttcgtcattg cttaa                                     205
```

Este Northern blott detectó una banda con tamaño similar al de HrBP1 en todas las especies de plantas analizadas, incluyendo tabaco, trigo, maiz, cítricos, algodón, pasto,

61

pansy, pimienta, papa, tomate, soya, girasol, frijol
lima, lo que indicó que genes relacionados con HrBP1
existen universalmente. Vea figura 6.

66

Ejemplo 9

El homólogo de HrBP1 de arroz, R6, fue clonado por
monitoreo por dos-híbridos en levadura utilizando harpin
como anzuelo. No solamente interactuó con harpin de
longitud total, sino que también interactuó con un
fragmento de harpin que contiene el segundo dominio HR
(vea figura 7). Sin embargo no es un ADNc de longitud
total; existe alguna información de la secuencia perdida
del término 5'. La secuencia parcial de ADNc del similar
al HrBP1 de arroz codifica un péptido de 203 aminoácidos,
R6-p, que comienza en el aminoácido 84 de HrBP1p. Ellos
son 74.4% idénticos y 87.2% positivos a nivel de
proteína, y 65% idénticos a nivel de ADN.

El siguiente muestra el alineamiento de la secuencia
de HrBP1 (SEQ. ID. No. 1 comenzando en el aminoácido 84)
y R6 (SEQ. ID. No. 4) a nivel protéico:

At protein level: Identities = 151/203 (74.4%), Positives = 177/203 (87.2%), Gaps = 2/203 (0%)	
R6-p : 1	VAALKVKLLSAVSGLNRLAGSQEDLDRADAAARELEAAAGGGPVDLERDVKLQGRWRL
	+A LK+KLLS VSGLNRGL S +DL+RA+ AA+ELE A GGPVDL D+DKLQG+WRL
HrBP1p: 84	IALLKLKLLSVVSGLNRLVASVDDLERA EVAAKELETA--GGPVDLTDDLKLGKWRRL
R6-p : 61	VYSSAFSSRTLGGSRPGPPTGRLLPITLGQVFQRIDVVS KD FDNIVDVELGAPWPLPPVE
	+YSSAFSSR+LGGS RPG PTGRL+P+TLGQVFQRIDV SKDFDNI +VELGAPWP PP+E
HrBP1p: 142	LYSSAFSSRS LGGS RPGLPTGR LIPVTLGQVFQRIDVFS KD FDNIAEVELGAPWPFPPLE
R6-p : 121	LTATLAHKFEIIGTSSIKITFDKTTVKTGNLSQLPPLEVPRIPDNLRPPSNTGSGEFEV
	TATLAHKFE++GT IKITF+KTTVKT GNLSQ+PP ++PR+PD+ RP SN G+G+FEV
HrBP1p: 202	ATATLAHKFELLGTCKIKITFEKTTVKTSGNLSQIPFDIPRLPDSFRPSSNPGTGDFEV
R6-p : 181	TYLDGDTRITRGDRGELRVFVIS 203
	TY+D RITRGDRGELRVFI+
HrBP1p: 262	TYVDDTMRITRGDRGELRVFVIA 284

62

A nivel protéico: Identidades=151/203 (74.4%),
Positivos=177/203 (87.2%), Brechas=2/203 (0%)

El alineamiento de la secuencia a nivel de ADN, de
R6 (SEQ.ID. No. 5) y HrBP1 (SEQ. ID. No. 2) comenzando del
nucleótido 265 (nucleótido 249 del marco de lectura
abierta))

A nivel de ADN: Identidades=397/610 (65%) (los puntos
indican bases idénticas)

R6	1	cgtaggtgcgctcaaagtcaagcttctgagcgcggtgtccgggctgaaccgcggcctcgc
HrBP1	249	aa.t..atta.....c....at.a..t..t.ta..t..g..at.a...a.a...a..t.t
R6	61	ggggagccaggaggatcttgaccgcgccgacgcggcgggagctcgaggcgggcggc
HrBP1	309	..c...tggt..t...t.a..aa.a..t..a.t...t..taaa..a..t..aa.t...--
R6	121	gggtggcgggccccgctcgacctggagagggacgtggacaagctgcagggcggtggaggt
HrBP1	366	---...g..a..g..t..tt.aaccgat..tc.t..t.....t..a....aaa.....
R6	181	ggtgtacagcagcgcttctcgtcgcggaagctcggcggcagccgccccggcccgccac
HrBP1	423	.t....t..t..t.....t..t...t..tt.a..t..t.....t..t..ta..t..
R6	241	cggccgcctcctccccatcacccctcgggcagggtgtttcagaggatcgatgtgtcagcaa
HrBP1	483	t..a..tt.ga....tg..t..t..t..c.....ac....t....gt.t....
R6	301	ggacttcgacaacatcgatgtcgagctcggcgcgccatggcgctgccgcgggtgga
HrBP1	543	a..t..t..t.....a.ca..g..g..at.a..a..c..t.....at..t....at.a..
R6	361	gctgacggcgaccctggctcacaagtttgagatcatcggcacctcgagcataaagatcac
HrBP1	603	agcc..t.....at.....a.....ac..t.a.....t.gc.ag..c.....a..
R6	421	attcgacaagacgacggtgaagacgaaggggaacctgtcccagctgcgcggctggaggt
HrBP1	663	...t..g..a..a..t.....atc...a..t....g...a..t..t..t..ta..
R6	481	ccctcgcatcccggacaacctccggccgcccgtccaacacgggcagcgggaggttcgaggt
HrBP1	723	...ga.gc.t..c....ggtt..a.a..at....a...c.t..a.ct..g..t....a..
R6	541	gacctacctcgacggcgacacccgcacacccgcggggacagaggggagctcaggggtgtt
HrBP1	783	t.....tg..t..t.atac..tg.....a..t.....t..a..t....a..
R6	601	cgtcacatctcg
HrBP1	843	tg..t

Ejemplo 10

Se cultivaron Plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia en mezcla autoclavada en un cuarto ambientalmente controlado a temperaturas día y noche de 23-20 °C y un fotoperiodo de 14 horas de luz.

Una aproximación transgénica fue utilizada para análisis funcional de HrBP1. El HrBP1 contrasentido, el cual es complementario a la SEQ. ID. No. 2, fue subclonado en el vector binario pPZP212, bajo control del promotor NOS. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se transformaron con el constructo con el método mediado por *Agrobacteria*. La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada fue GV3101 (C58C1 Rif^r) pMP90 (Gmr). Las líneas contrasentido fueron denominadas como "as".

Las plantas de *Arabidopsis* fueron también transformadas con el constructo, que tenía una repetición invertida con la cadena en sentido de HrBP1 de la región codificadora de las bases 4-650 (bases 20-666 de la SEQ. ID. No. 2) y la secuencia complementaria de las bases 20-516 de HrBP1 del ADNc (SEQ. ID. No. 2). Este constructo generaba un ARNm de doble cadena en las plantas transformadas. Estas líneas transgénicas fueron designadas como líneas "d".

La figura 8 muestra las construcciones utilizadas para transformar *Arabidopsis*.

Tanto la aproximación sin sentido como la de doble sentido se hicieron para silenciar la expresión de HrBP1. El método de la doble cadena de ARN se encontró que fue mas eficiente en silenciar el gen HrBP1. Algunas líneas

68

64

transgénicas de *Arabidopsis* mostraron lesiones espontáneas que mimetizaron una HR. La línea mas severa estaba retardada en su desarrollo, se veía muy enferma y no produjo semillas.

Ejemplo 11

Las plantas se cultivaron en mezcla para materos autoclavada en un cuarto con el ambiente controlado con una temperatura día noche de 23-20 °C y un fotoperiodo de 14 horas de luz. Las plantas de 25 días se inocularon con *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 sumergiendo las partes aéreas de la planta en 10⁸ células por mililitro de suspensión de bacteria por 10 segundos. Siete días luego de la inoculación con DC3000, se recolectaron discos de hojas con un perforador. La bacteria se extrajo de los discos de hoja en 10mM de MgCl₂ y se sembró en Agar B de King que contenía 100 µl/ml de rifampicina. Las placas se incubaron a 28 °C por 2 días (figura 9B) y las colonias se contaron. En la figura 9 A, las plantas de *Arabidopsis* silvestres tenían significativamente mayor desarrollo de la enfermedad que las plantas transgénicas. El conteo de bacteria (Figura 9C) mostró que las plantas transgénicas tenían al menos una magnitud menos de DC3000 creciendo dentro de las hojas. HrBP1 parecía como un regulador negativo de la vía de transducción de la señal de defensa de la planta en *Arabidopsis*. Su silenciamiento impartió a las plantas la habilidad de resistir a *Pseudomonas syringae* pv. tomate DC3000.

70

Ejemplo 12

La región codificadora de HrBP1, bases 17-871 de la SEQ. ID. No. 2 fue subclonada en el vector binario pPZP212 el cual está bajo el control del promotor NOS (vea figura 10). Las plantas de tabaco se transformaron con la construcción por el método mediado por *Agrobacterium*. La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada fue LBA4404.

Ejemplo 13

HrBP1 fue sobre-expresado en plantas de tabaco bajo el control de un promotor NOS. La figura 10 muestra la construcción utilizada para la transformación del tabaco. Tres líneas con alta expresión fueron escogidas para estudios posteriores en la generación T2. Cuando se infiltraban con harpin purificado, las líneas transgénicas desarrollaron HR mucho mas rápido que las plantas de tipo silvestre, lo que es consistente con experimentos previos en los cuales HrBP1 etiquetado con His incrementó la sensibilidad del tabaco a la proteína harpin. Las líneas que sobre-expresaban HrBP1 fueron cerca de 20-30% mas altas que las plantas silvestres Xanthi NN (vea figura 11).

Ejemplo 14

Plantas de tabaco de 61 días de edad silvestres y Xanthi NN sobre-expresoras fueron inoculadas con virus del mosaico del tabaco frotando el TMV con tierra

66

diatomácea en la superficie superior de las hojas. Las lesiones aparecieron dos días después de la inoculación manual. La foto en la figura 12 A fue tomada 3 días luego de la inoculación. El diámetro de las manchas de la enfermedad fue medido. En promedio, el diámetro de las lesiones en las hojas de las plantas transgénicas fue 33.4% menor que en las plantas silvestres (figura 12 B). Entonces el área de superficie de las hojas de las plantas transgénicas fue cerca del 44.3% de aquellas de las plantas silvestres. HrBP1 parece ser un regulador positivo de la vía de transducción de la señal en la planta para crecimiento y resistencia a las enfermedades en tabaco.

Aunque el invento ha sido descrito en detalle para propósito de ilustración, se entiende que dichos detalles son solamente para éste propósito, y que se pueden hacer variaciones por personas con conocimiento en el área sin alejarse del espíritu y del enfoque del invento el cual es definido por las siguientes reivindicaciones.

71

REIVINDICACIONES:

1. Una proteína aislada la cual sirve como un receptor en plantas para inductores patógenos vegetales de respuesta hipersensible.

2. Una proteína según la reivindicación 1, en donde el patógeno vegetal es seleccionado entre *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthamonas*, *Phytophthora*, y *Clavibacter*.

3. Una proteína según la reivindicación 2, en donde el patógeno vegetal es un patógeno *Erwinia*.

4. Una proteína según la reivindicación 3, en donde el patógeno vegetal es *Erwinia amylovora*.

5. Una proteína según la reivindicación 1, en donde la proteína proviene de un monocotiledóneo.

6. Una proteína según la reivindicación 5, en donde la proteína proviene del arroz.

7. Una proteína según la reivindicación 1, en donde la proteína tiene una secuencia de aminoácidos parcial de la SEQ. ID. No. 4.

8. Una proteína según la reivindicación 1, en donde la proteína proviene de un dicotiledóneo.

9. Una proteína según la reivindicación 8, en donde la proteína proviene de la *Arabidopsis thaliana*.

10. Una proteína según la reivindicación 1, en donde la proteína tiene una secuencia de aminoácidos parcial de la SEQ. ID. No. 1.

11. Una proteína según la reivindicación 1, en donde la proteína es recombinante.

12. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína según la reivindicación 1.

72

13. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde el patógeno vegetal es seleccionado entre *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthamonas*, *Phytophthora*, y *Clavibacter*.

14. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 13, en donde el patógeno vegetal es un patógeno *Erwinia*.

15. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 14, en donde el patógeno vegetal es *Erwinia amylovora*.

16. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde la proteína proviene de un monocotiledóneo.

17. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 16, en donde la proteína proviene del arroz.

18. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde la proteína tiene una secuencia de aminoácidos parcial de la SEQ. ID. No. 4.

19. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C.

20. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde el ácido nucleico tiene una secuencia nucleótida que comprende la SEQ. ID. No. 5.

74

21. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde la proteína proviene de un dicotiledóneo.

22. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 21, en donde la proteína proviene de la *Arabidopsis thaliana*.

23. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde la proteína tiene una secuencia de aminoácidos parcial de la SEQ. ID. No. 1.

24. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2 ó 9 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C.

25. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde el ácido nucleico tiene una secuencia nucleótida que comprende la SEQ. ID. No. 2.

26. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C.

27. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde el ácido nucleico tiene una secuencia nucleótida que comprende la SEQ. ID. No. 3.

28. Una molécula de ácido nucleico antisentido según la reivindicación 12.

75

29. Un vector de expresión que contiene una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12 el cual es heterólogo al vector de expresión.

30. Un vector de expresión según la reivindicación 29, en donde la molécula del ácido nucleico es situada en el vector de expresión en orientación con sentido y un correcto marco de lectura.

31. Un vector de expresión según la reivindicación 29, en donde, tanto: (1) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1; (2) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2 ó 9 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (3) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2; (4) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (5) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3; (6) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 4; (7) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; ó (8) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5.

76

32. Un vector de expresión que contiene una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 28 el cual es heterólogo al vector de expresión.

33. Una célula hospedera transgénica transformada con la molécula del ácido nucleico según la reivindicación 12.

34. Una célula hospedera transformada según la reivindicación 33, en donde la célula hospedera es seleccionada entre una célula vegetal y una célula bacteriana.

35. Una célula hospedera según la reivindicación 33, en donde la molécula de ADN es transformada con un sistema de expresión.

36. Una célula hospedera según la reivindicación 33, en donde tanto: (1) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1; (2) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2 ó 9 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (3) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2; (4) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (5) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3; (6) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 4; (7) el ácido

77

nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; 6 (8) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5.

37. Una célula hospedera transformada con una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 28.

38. Una planta transgénica transformada con la molécula de ADN de la reivindicación 12.

39. Una planta transgénica según la reivindicación 38, en donde la planta es seleccionada entre alfalfa, arroz, trigo, cebada, centeno, algodón, girasol, maní, maíz, papa, batata, achicoria, lechuga, escarola, repollo, col de Bruselas, remolacha, chiviría, coliflor, brócoli, nabo, rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimienta, apio, zanahoria, calabaza, calabacín, pepino, manzana, pera, melón, cítrico, fresa, uva, frambuesa, piña, soja, tabaco, tomate, sorgo, y caña de azúcar.

40. Una planta transgénica según la reivindicación 38, en donde la planta es seleccionada entre *Arabidopsis thaliana*, *Saintpaulia*, petunia, pelargonio, flor de fuego, crisantemo, clavel, y cinnia.

41. Una planta transgénica según la reivindicación 38, en donde la planta es un monocotiledóneo.

42. Una planta transgénica según la reivindicación 38, en donde la planta proviene de un dicotiledóneo.

43. Una planta transgénica según la reivindicación 38, en donde tanto: (1) la proteína tiene una secuencia

Z
78

de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1; (2) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2 ó 9 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (3) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2; (4) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (5) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3; (6) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 4; (7) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; 6 (8) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5.

44. Una planta transgénica transformada con una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 28.

45. Una semilla de planta transgénica transformada con la molécula de ADN de la reivindicación 12.

46. Una planta transgénica según la reivindicación 45 en donde la planta es seleccionada entre alfalfa, arroz, trigo, cebada, centeno, algodón, girasol, maní, maíz, papa, batata, achicoria, lechuga, escarola, repollo, col de Bruselas, remolacha, chiviría, coliflor,

brócoli, nabo, rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimienta, apio, zanahoria, calabaza, calabacín, pepino, manzana, pera, melón, cítrico, fresa, uva, frambuesa, piña, soja, tabaco, tomate, sorgo, y caña de azúcar.

47. Una planta transgénica según la reivindicación 45, en donde la planta es seleccionada entre *Arabidopsis thaliana*, *Saintpaulia*, petunia, pelargonio, flor de fuego, crisantemo, clavel, y cinnia.

48. Una planta transgénica según la reivindicación 45, en donde la planta es un monocotiledóneo.

49. Una planta transgénica según la reivindicación 45, en donde la planta proviene de un dicotiledóneo.

50. Una planta transgénica según la reivindicación 45, en donde, tanto: (1) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1; (2) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2 ó 9 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (3) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2; (4) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (5) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3; (6) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 4; (7) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la

SEQ. ID. No. 5 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; 6 (8) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5.

51. Una semilla de planta transgénica transformada con una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 28.

52. Un método para identificar agentes que tiene como objetivo células vegetales, el cual comprende:

formar una mezcla de reacción que comprende una proteína según la reivindicación 1 y un agente candidato;

evaluar la mezcla de reacción para unión entre la proteína y el agente candidato; y

identificar compuestos candidatos los cuales se unen a la proteína en la mezcla de reacción como agentes objetivo de células vegetales.

53. Un método según la reivindicación 52, en donde la proteína proviene de un monocotiledóneo.

54. Un método según la reivindicación 53, en donde la proteína proviene del arroz.

55. Un método según la reivindicación 52, en donde la proteína tiene una secuencia de aminoácidos parcial de la SEQ. ID. No. 4.

56. Un método según la reivindicación 52, en donde la proteína proviene de un dicotiledóneo.

57. Un método según la reivindicación 56, en donde la proteína proviene de la *Arabidopsis thaliana*.

58. Un método según la reivindicación 52, en donde la proteína tiene una secuencia de aminoácidos parcial de la SEQ. ID. No. 1.

59. Un método para identificar agentes que tiene como objetivo células vegetales, el cual comprende:

formar una mezcla de reacción que comprende una célula hospedera transformada con una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12 y un agente candidato;

evaluar la mezcla de reacción para unión entre la proteína producida por la célula hospedera y el agente candidato; y

identificar compuestos candidatos los cuales se unen a la proteína producida por la célula hospedera en la mezcla de reacción como agentes objetivo de células vegetales.

60. Un método según la reivindicación 59, en donde la proteína proviene de un monocotiledóneo.

61. Un método según la reivindicación 60, en donde la proteína proviene del arroz.

62. Un método según la reivindicación 59, en donde la proteína proviene de un dicotiledóneo.

63. Un método según la reivindicación 62, en donde la proteína proviene de la *Arabidopsis thaliana*.

64. Un método según la reivindicación 59, en donde, tanto: (1) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1; (2) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2 ó 9 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización

~~82~~
82

que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (3) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2; (4) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (5) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3; (6) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 4; (7) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; ó (8) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5.

65. Un método para mejorar la receptividad de la planta al tratamiento con inductores de la respuesta hipersensible, el cual comprende:

proporcionar una planta transgénica o una semilla de planta transgénica transformada con la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12.

66. Un método según la reivindicación 65, en donde, tanto: (1) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1; (2) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2 ó 9 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de

salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (3) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2; (4) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (5) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3; (6) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 4; (7) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; 6 (8) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5.

67. Un método según la reivindicación 65, en donde una planta transgénica es proporcionada.

68. Un método según la reivindicación 65, en donde una semilla de planta transgénica es proporcionada y dicho método además comprende:

sembrar las semillas de las plantas bajo condiciones que sean efectivas para que las plantas crezcan a partir de las semillas sembradas.

69. Un método según la reivindicación 65, en donde la planta es seleccionada entre alfalfa, arroz, trigo, cebada, centeno, algodón, girasol, maní, maíz, papa, batata, achicoria, lechuga, escarola, repollo, col de Bruselas, remolacha, chiviría, coliflor, brócoli, nabo,

rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimienta, apio, zanahoria, calabaza, calabacín, pepino, manzana, pera, melón, cítrico, fresa, uva, frambuesa, piña, soja, tabaco, tomate, sorgo, y caña de azúcar.

70. Un método según la reivindicación 65, en donde la planta es seleccionada entre *Arabidopsis thaliana*, *Saintpaulia*, petunia, pelargonio, flor de fuego, crisantemo, clavel, y cinnia.

71. Un método según la reivindicación 65, en donde el tratamiento con inductores de la respuesta hipersensible es para impartir resistencia a la enfermedad.

72. Un método según la reivindicación 65, en donde el tratamiento con inductores de la respuesta hipersensible es para mejorar el crecimiento de las plantas.

73. Un método según la reivindicación 65, en donde el tratamiento con inductores de la respuesta hipersensible es para controlar insectos.

74. Un método según la reivindicación 65, en donde el tratamiento con inductores de la respuesta hipersensible es para impartir tolerancia al estrés.

75. Un método según la reivindicación 65, en donde la planta transgénica o semilla de planta es adicionalmente transformada con un segundo ácido nucleico que codifica un inductor de la respuesta hipersensible, en donde la expresión del segundo ácido nucleico surte efecto sobre el tratamiento con inductores de la respuesta hipersensible.

85

76. Un método según la reivindicación 65, en donde el tratamiento con inductores de la respuesta hipersensible comprende:

aplicar un inductor de la respuesta hipersensible a la planta o semilla de la planta.

77. Un método según la reivindicación 76, en donde el inductor de la respuesta hipersensible es aplicado de manera aislada.

78. Un método para impartir resistencia a la enfermedad, mejorar el crecimiento, controlar insectos, y/o impartir resistencia al estrés, el cual comprende:

proporcionar una planta transgénica o semilla de planta transgénica transformada con una construcción de ADN efectiva para silenciar la expresión de una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12.

79. Un método según la reivindicación 78, en donde la proteína proviene de un monocotiledóneo.

80. Un método según la reivindicación 79, en donde la proteína proviene del arroz.

81. Un método según la reivindicación 78, en donde la proteína proviene de un dicotiledóneo.

82. Un método según la reivindicación 81, en donde la proteína proviene de la *Arabidopsis thaliana*.

83. Un método según la reivindicación 78, en donde, tanto: (1) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1; (2) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2 ó 9 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de

85

salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (3) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2; (4) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (5) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3; (6) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 4; (7) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; 6 (8) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5.

84. Un método según la reivindicación 78, en donde la planta transgénica es proporcionada.

85. Un método según la reivindicación 78, en donde una semilla de planta transgénica es proporcionada y dicho método además comprende:

sembrar las semillas de las plantas bajo condiciones que sean efectivas para que las plantas crezcan a partir de las semillas sembradas.

86. Un método según la reivindicación 78, en donde la planta es seleccionada entre alfalfa, arroz, trigo, cebada, centeno, algodón, girasol, maní, maíz, papa, batata, achicoria, lechuga, escarola, repollo, col de Bruselas, remolacha, chiviría, coliflor, brócoli, nabo,

rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimienta, apio, zanahoria, calabaza, calabacín, pepino, manzana, pera, melón, cítrico, fresa, uva, frambuesa, piña, soja, tabaco, tomate, sorgo, y caña de azúcar.

87. Un método según la reivindicación 78, en donde la planta es seleccionada entre *Arabidopsis thaliana*, *Saintpaulia*, petunia, pelargonio, flor de fuego, crisantemo, clavel, y cinnia.

88. Un método según la reivindicación 78, en donde la planta transgénica o semilla de planta es adicionalmente transformada con un segundo ácido nucleico que codifica un inductor de la respuesta hipersensible, en donde la expresión del segundo ácido nucleico surte efecto sobre el tratamiento con inductores de la respuesta hipersensible.

89. Un método según la reivindicación 78 que además comprende:

aplicar un inductor de la respuesta hipersensible a una planta o semilla de planta.

90. Un método según la reivindicación 89 en donde el inductor de la respuesta hipersensible es aplicado de manera aislada.

91. Un método según la reivindicación 78, en donde resistencia a la enfermedad es impartida a las plantas.

92. Un método según la reivindicación 78, en donde un crecimiento mejorado de las plantas es impartido a las mismas.

93. Un método según la reivindicación 78, en donde un controlar insectos es impartido a las plantas.

87

88

94. Un método según la reivindicación 78, en donde una tolerancia al estrés es impartida.

95. Un método según la reivindicación 78, en donde la construcción de ADN es una molécula de ácido nucleico antisentido a una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor en plantas para inductores de la respuesta hipersensible de patógenos vegetales.

96. Un método según la reivindicación 78, en donde la construcción de ADN se puede transcribir a un primer ácido nucleico que codifica un receptor en plantas para inductores de la respuesta hipersensible de patógenos vegetales acoplados a un segundo ácido nucleico que codifica el complemento invertido del primer ácido nucleico.

97. Un método para impartir resistencia a la enfermedad, mejorar el crecimiento, controlar insectos, y/o impartir resistencia al estrés en plantas, el cual comprende:

proporcionar una planta transgénica o semilla de planta transgénica transformada con una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12.

98. Un método según la reivindicación 97, en donde, tanto: (1) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1; (2) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 2 ó 9 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (3) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ.

79

ID. No. 2; (4) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; (5) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 3; (6) la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 4; (7) el ácido nucleico se hibridiza en la secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5 bajo condiciones rigurosas de amortiguador de hibridización que comprende 20% de formamida en buffer de 0.9M de salina/0.09M SSC a una temperatura de 42°C; ó (8) el ácido nucleico comprende una secuencia nucleótida de la SEQ. ID. No. 5.

99. Un método según la reivindicación 97, en donde la planta transgénica es proporcionada.

100. Un método según la reivindicación 97, en donde una semilla de planta transgénica es proporcionada y dicho método además comprende:

sembrar las semillas de las plantas bajo condiciones que sean efectivas para que las plantas crezcan a partir de las semillas sembradas.

101. Un método según la reivindicación 97, en donde la planta es seleccionada entre alfalfa, arroz, trigo, cebada, centeno, algodón, girasol, maní, maíz, papa, batata, achicoria, lechuga, escarola, repollo, col de Bruselas, remolacha, chiviría, coliflor, brócoli, nabo, rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimienta, apio, zanahoria, calabaza, calabacín, pepino, manzana,

X
76
90

pera, melón, cítrico, fresa, uva, frambuesa, piña, soja, tabaco, tomate, sorgo, y caña de azúcar.

102. Un método según la reivindicación 97, en donde la planta es seleccionada entre *Arabidopsis thaliana*, *Saintpaulia*, petunia, pelargonio, flor de fuego, crisantemo, clavel, y cinnia.

103. Un método según la reivindicación 97, en donde resistencia a la enfermedad es impartida.

104. Un método según la reivindicación 97, en donde un crecimiento vegetal es mejorado.

105. Un método según la reivindicación 97, en donde insectos son controlados.

106. Un método según la reivindicación 97, en donde una tolerancia al estrés es impartida.

107. Un método según la reivindicación 97, en donde la proteína proviene de un monocotiledóneo.

108. Un método según la reivindicación 107, en donde la proteína proviene del arroz.

109. Un método según la reivindicación 97, en donde la proteína proviene de un dicotiledóneo.

110. Un método según la reivindicación 109, en donde la proteína proviene de la *Arabidopsis thaliana*.

SEQUENCE LISTING

<110> Eden Bioscience Corporation

<120> RECEPTORS FOR HYPERSENSITIVE RESPONSE ELICITORS AND
USES THEREOF

<130> 21829/66

<140>

<141>

<150> 60/191,649

<151> 2000-03-23

<150> 60/250,710

<151> 2000-12-01

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 284

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Ala Thr Ser Ser Thr Phe Ser Ser Leu Leu Pro Ser Pro Pro Ala
1 5 10 15

Leu Leu Ser Asp His Arg Ser Pro Pro Pro Ser Ile Arg Tyr Ser Phe
20 25 30

Ser Pro Leu Thr Thr Pro Lys Ser Ser Arg Leu Gly Phe Thr Val Pro
35 40 45

Glu Lys Arg Asn Leu Ala Ala Asn Ser Ser Leu Val Glu Val Ser Ile
50 55 60

Gly Gly Glu Ser Asp Pro Pro Pro Ser Ser Ser Gly Ser Gly Gly Asp
65 70 75 80

Asp Lys Gln Ile Ala Leu Leu Lys Leu Lys Leu Leu Ser Val Val Ser
85 90 95

Gly Leu Asn Arg Gly Leu Val Ala Ser Val Asp Asp Leu Glu Arg Ala
100 105 110

92

Glu Val Ala Ala Lys Glu Leu Glu Thr Ala Gly Gly Pro Val Asp Leu
115 120 125

Thr Asp Asp Leu Asp Lys Leu Gln Gly Lys Trp Arg Leu Leu Tyr Ser
130 135 140

Ser Ala Phe Ser Ser Arg Ser Leu Gly Gly Ser Arg Pro Gly Leu Pro
145 150 155 160

Thr Gly Arg Leu Ile Pro Val Thr Leu Gly Gln Val Phe Gln Arg Ile
165 170 175

Asp Val Phe Ser Lys Asp Phe Asp Asn Ile Ala Glu Val Glu Leu Gly
180 185 190

Ala Pro Trp Pro Phe Pro Pro Leu Glu Ala Thr Ala Thr Leu Ala His
195 200 205

Lys Phe Glu Leu Leu Gly Thr Cys Lys Ile Lys Ile Thr Phe Glu Lys
210 215 220

Thr Thr Val Lys Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Ile Pro Pro Phe Asp
225 230 235 240

Ile Pro Arg Leu Pro Asp Ser Phe Arg Pro Ser Ser Asn Pro Gly Thr
245 250 255

Gly Asp Phe Glu Val Thr Tyr Val Asp Asp Thr Met Arg Ile Thr Arg
260 265 270

Gly Asp Arg Gly Glu Leu Arg Val Phe Val Ile Ala
275 280

<210> 2
<211> 1000
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2
tttttccttc tcaacaatgg cgacttccttc tactttctcg tcactactac cttcaccacc 60
agctcttctt tccgaccacc gttctcctcc accatccatc agatactcct tttctccctt 120
aactactcca aaatcgtctc gtttgggttt cactgtaccg gagaagagaa acctcgctgc 180
taattcgtct ctcggtgaag tatccattgg cggagaaagt gacccaccac catcatcatc 240
tggatcagga ggagacgaca agcaaattgc attactcaaa ctcaaattac ttagtgtagt 300
ttcgggatta aacagaggac ttgtggcgag tggtgatgat ttagaaagag ctgaagtggc 360
tgctaaagaa cttgaaactg ctgggggacc ggttgattta accgatgatc ttgataagct 420

93

ttactgttaa gattcgatta tagagtgaat tttgggaaga tttttcagat ttgatttgtg 1860
atgtgttgtg ttgtgagaaa ttgcagagtg tagtttcggg attaaacaga ggacttgtgg 1920
cgagtgttga tgatttagaa agagctgaag tggctgctaa agaacttgaa actgctgggg 1980
gaccggttga ttttaaccgat gatcttgata agcttcaagg gaaatggagg ctggtgtata 2040
gtagtgcgtt ctcttctcgg tcttttaggtg gtagccgtcc tggctctacct actggacgtt 2100
tgatccctgt tactcttggc caggtaattc ttgaatcatt gctctgtttt taccctgcaa 2160
gattcggttt ttcgggtaag ttgttgagga gtttatgtgc atggtctagt ctatcatcaa 2220
tagtcttgct tgagtttgaa tggggctgag ctaagaatct agctttctga ggttacaatt 2280
tggtaatgtc atcttatact cgaagcaaaa cttttttcta tattgtcaag tttatgtgta 2340
cggctctggc tatcattggg agtctttggt gagcttgaat ggtgaggagc ttagaatcta 2400
gcaatgtcat ctactcctta atcatttttt tctatattgc caagtttatg tgtacgggtc 2460
tagtcaatca tctttattct tggttgagtt tgaatggtga tgagcttaga atctagcttt 2520
ctttggttta aatttggaag agaaccatac ctgaatcggg agaaagcaaa cttctttaat 2580
attatctctt gtttctgaat cattaaaaca ggtgtttcaa cggattgatg tgtttagcaa 2640
agattttgat aacatagcag aggtggaatt aggagcccct tggccatttc cgccattaga 2700
agccactgcg acattggcac acaagtttga actcttaggt ttgcatttcc ctttctctca 2760
ttaagttta cgaattgtgt aagagcaaaa taacttatct gtatctttga catttatggg 2820
gaaaacaggc acttgcaaga tcaagataac atttgagaaa acaactgtga agacatcggg 2880
aaacttgtcg cagattcctc cgtttgatat cccgaggctt cccgacagtt tcagaccatc 2940
gtcaaaccct ggaactgggg atttcgaagt tacctatggt gatgatacca tgcgcataac 3000
tcgcggggac agaggtgaac ttaggggtatt cgtcattgct taattctcaa agctttgaca 3060
tgtaaagata aataaatact ttctgcttga tgcagtctca tgagttttgt acaaatcatg 3120
tgaacatata aatgcgcttt ataagtaaat gagtgtcttg ttcaatgaat catatgaaag 3180
aatttgtatg actcagaaaa ttggacaatg atatagacct tccaaatttt gcacctcta 3240
atgtgagata ttagtgattt tttcttaggt tggtagagag aacggattgg caaaaaata 3300
tcgaaggcca atgattaaca gcaaaacat atcttgatga ttcaaaatat agagttaaca 3360
agcaaagatg agacaatctt atacgagaga gctaaaacaa atggattcca aatccagcaa 3420
gtacaaaaat cgcagaaaat aagatgaaac caacttaaaa cagagatggt ccctttccct 3480
tcttgtcacc accgatctcg aaatgcttgc acctctgaaa taaacaacaa accaacacaa 3540
tgtaagcaaa ttaccaagtt acaaatccgg tataatgaac tgatctatgt tctatgcacc 3600
ttgataggac gctgcgaaaa gtgcttgag ctttgacact gaagcctcaa aacaatcttc 3660
ttcgtgggtc tagcctgtta acaagattca caagatgtat ctcagtccaa aactgagact 3720
attggaatgt ctgtttcctc acagctcact tccaaaattc tactataaat ggttccttaa 3780
aactacctca tttcaactaa ctagacctaa ttcaaactga aaaaacaatc aatgcatgat 3840
aatcaatggt acctttttgt ggaagacagg cttagtctga ccaccataac cagattgttt 3900
acggtcataa cgacgctttc cttgagcagc aagactgtct ttacccttct tgtattgggt 3960
aaccttgtgc aaagtatgct ttttgcatc cttgttctta cagtaagtgt tctttgtctt 4020
tggaatgttc accttcaaaa ttcataaaat caaaaatgaa tcactcacac acatacaaaa 4080
tcaagagact ttttaaggta atcaaaatac aaacatcatt tagattgaaa acttttatga 4140
tagatctgaa aaacaatata ataaatcaat caacctatga ttgttgttct tcaaagtcaa 4200
cgaactttac aaattccaaa atcacatcga aagagaagaa acaatttacc attttcgct 4260

<210> 4
<211> 203
<212> PRT
<213> oryza

87
94

<400> 4

Val Ala Ala Leu Lys Val Lys Leu Leu Ser Ala Val Ser Gly Leu Asn
1 5 10 15

Arg Gly Leu Ala Gly Ser Gln Glu Asp Leu Asp Arg Ala Asp Ala Ala
20 25 30

Ala Arg Glu Leu Glu Ala Ala Ala Gly Gly Gly Pro Val Asp Leu Glu
35 40 45

Arg Asp Val Asp Lys Leu Gln Gly Arg Trp Arg Leu Val Tyr Ser Ser
50 55 60

Ala Phe Ser Ser Arg Thr Leu Gly Gly Ser Arg Pro Gly Pro Pro Thr
65 70 75 80

Gly Arg Leu Leu Pro Ile Thr Leu Gly Gln Val Phe Gln Arg Ile Asp
85 90 95

Val Val Ser Lys Asp Phe Asp Asn Ile Val Asp Val Glu Leu Gly Ala
100 105 110

Pro Trp Pro Leu Pro Pro Val Glu Leu Thr Ala Thr Leu Ala His Lys
115 120 125

Phe Glu Ile Ile Gly Thr Ser Ser Ile Lys Ile Thr Phe Asp Lys Thr
130 135 140

Thr Val Lys Thr Lys Gly Asn Leu Ser Gln Leu Pro Pro Leu Glu Val
145 150 155 160

Pro Arg Ile Pro Asp Asn Leu Arg Pro Pro Ser Asn Thr Gly Ser Gly
165 170 175

Glu Phe Glu Val Thr Tyr Leu Asp Gly Asp Thr Arg Ile Thr Arg Gly
180 185 190

Asp Arg Gly Glu Leu Arg Val Phe Val Ile Ser
195 200

<210> 5

<211> 613

<212> DNA

<213> oryza

<400> 5

cgtggctgcg ctcaaagtca agcttctgag cgcgggtgtcc gggctgaacc gcggcctcgc 60

28
95

ggggagccag gaggatcttg accgcgccga cgcggcggcg cgggagctcg aggcggcggc 120
gggtggcggc cccgtcgacc tggagagggg cgtggacaag ctgcaggggc ggtggaggct 180
ggtgtacagc agcgcgttct cgtcgcggac gctcggcggc agccgccccg gcccgccac 240
cggecgccctc ctcccatca ccctcgggca ggtgtttcag aggatcgatg ttgtcagcaa 300
ggacttcgac aacatcgctc atgtcgagct cggcgcggca tggccgctgc cgccggtgga 360
gctgacggcg accctggctc acaagtttga gatcatcggc acctcgagca taaagatcac 420
attcgacaag acgacggtga agacgaaggg gaacctgtcc cagctgccgc cgctggaggt 480
ccctcgcac cggacaacc tccggccgcc gtccaacacc ggcagcggcg agttcgaggt 540
gacctacctc gacggcgaca cccgcatcac ccgcggggac agaggggagc tcagggtgtt 600
cgtcatctcg, tga 613

<210> 6
<211> 26
<212> PRT
<213> Xanthomonas campestris pv. glycines

<400> 6
Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Val Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala
1 5 10 15
Ala Ile Ala Leu Pro Ala Tyr Gln Asp Tyr
20 25

<210> 7
<211> 114
<212> PRT
<213> Xanthomonas campestris pv. pelargonii

<400> 7
Met Asp Ser Ile Gly Asn Asn Phe Ser Asn Ile Gly Asn Leu Gln Thr
1 5 10 15
Met Gly Ile Gly Pro Gln Gln His Glu Asp Ser Ser Gln Gln Ser Pro
20 25 30
Ser Ala Gly Ser Glu Gln Gln Leu Asp Gln Leu Leu Ala Met Phe Ile
35 40 45
Met Met Met Leu Gln Gln Ser Gln Gly Ser Asp Ala Asn Gln Glu Cys
50 55 60
Gly Asn Glu Gln Pro Gln Asn Gly Gln Gln Glu Gly Leu Ser Pro Leu
65 70 75 80
Thr Gln Met Leu Met Gln Ile Val Met Gln Leu Met Gln Asn Gln Gly
85 90 95

96

Gly Ala Gly Met Gly Gly Gly Gly Ser Val Asn Ser Ser Leu Gly Gly
100 105 110

Asn Ala

<210> 8

<211> 342

<212> DNA

<213> *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*

<400> 8

atggactcta tcggaacaa cttttcgaat atcggcaacc tgcagacgat gggcatcggg 60
cctcagcaac acgaggactc cagccagcag tcgccttcgg ctggctccga gcagcagctg 120
gatcagttgc tcgcatgtt catcatgatg atgctgcaac agagccaggg cagcagtgca 180
aatcaggagt gtggcaacga acaaccgcag aacgggtcaac aggaaggcct gagtccgttg 240
acgcagatgc tgatgcagat cgtgatgcag ctgatgcaga accagggcgg cgccggcatg 300
ggcggtgggc gttcgggtcaa cagcagcctg ggcggcaacg cc 342

<210> 9

<211> 205

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe

<400> 9

gatcaagata acatttgaga aaacaactgt gaagacatcg ggaaacttgt cgcagattcc 60
tccgtttgat atcccagggc ttcccgacag ttccagacca tcgtcaaac ctggaactgg 120
ggatttcgaa gttacctatg ttgatgatac catgcgcata actcgcgggg acagagggtga 180
acttagggta ttcgtcattg cttaa 205

27
97

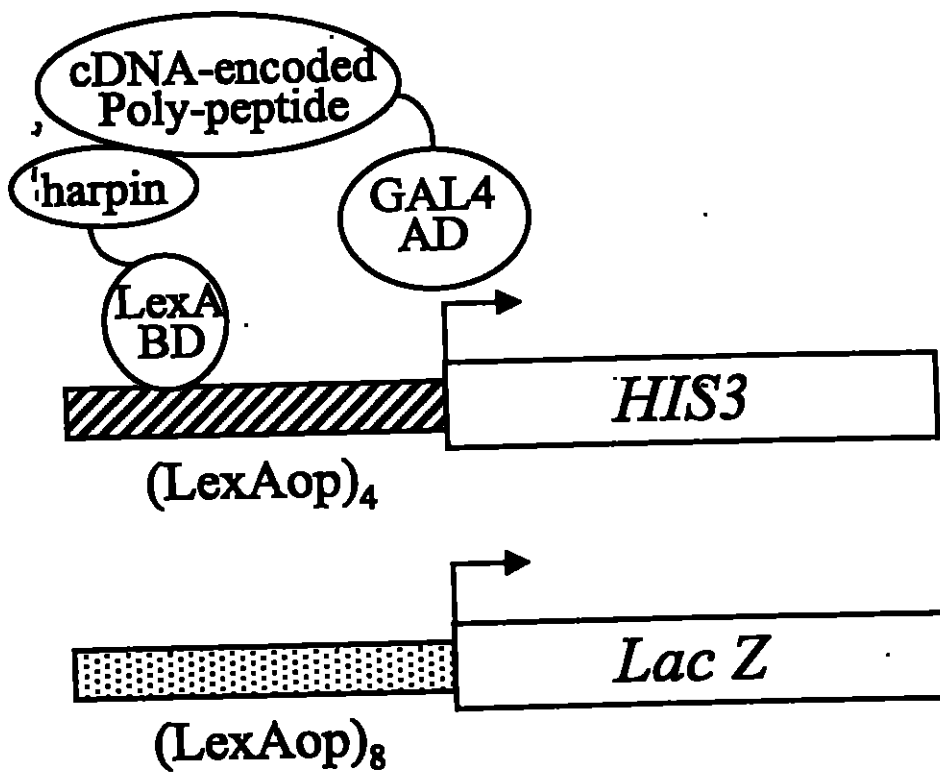
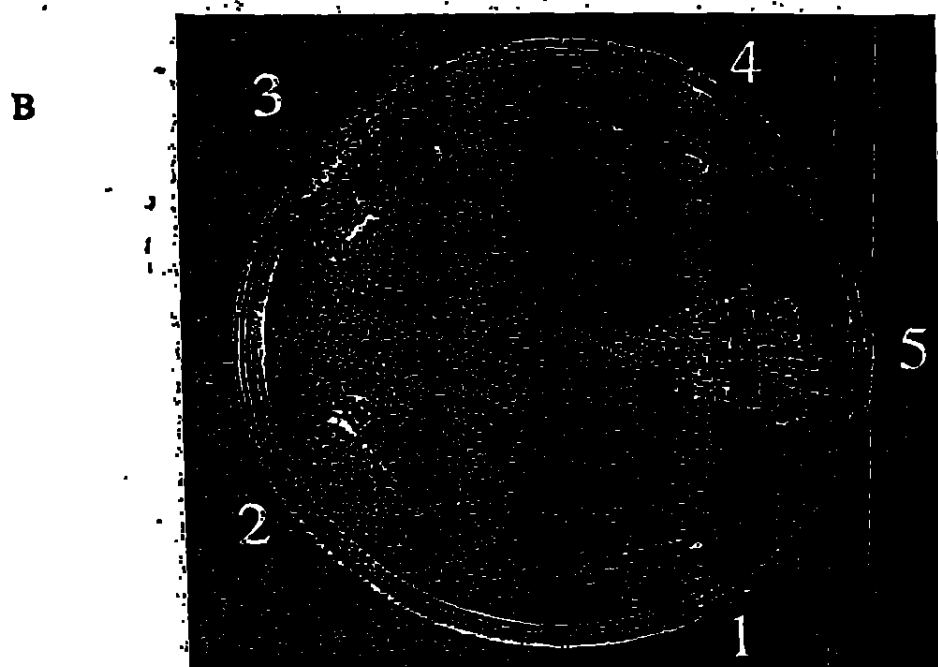
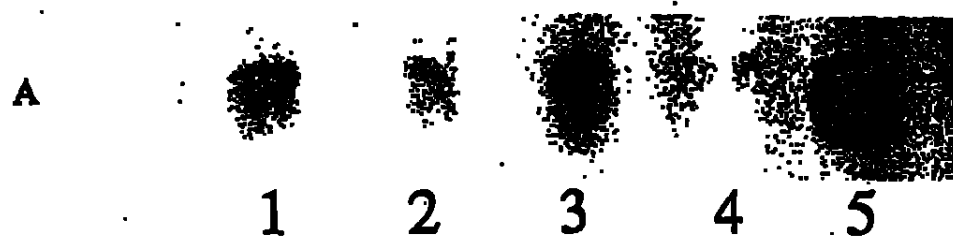


Figure 1



	Bait	Prey
1	harpin	empty vector
2	harpin	unrelated protein
3	empty vector	harpin
4	unrelated protein	harpin
5	(positive control)	

Figure 2

99184

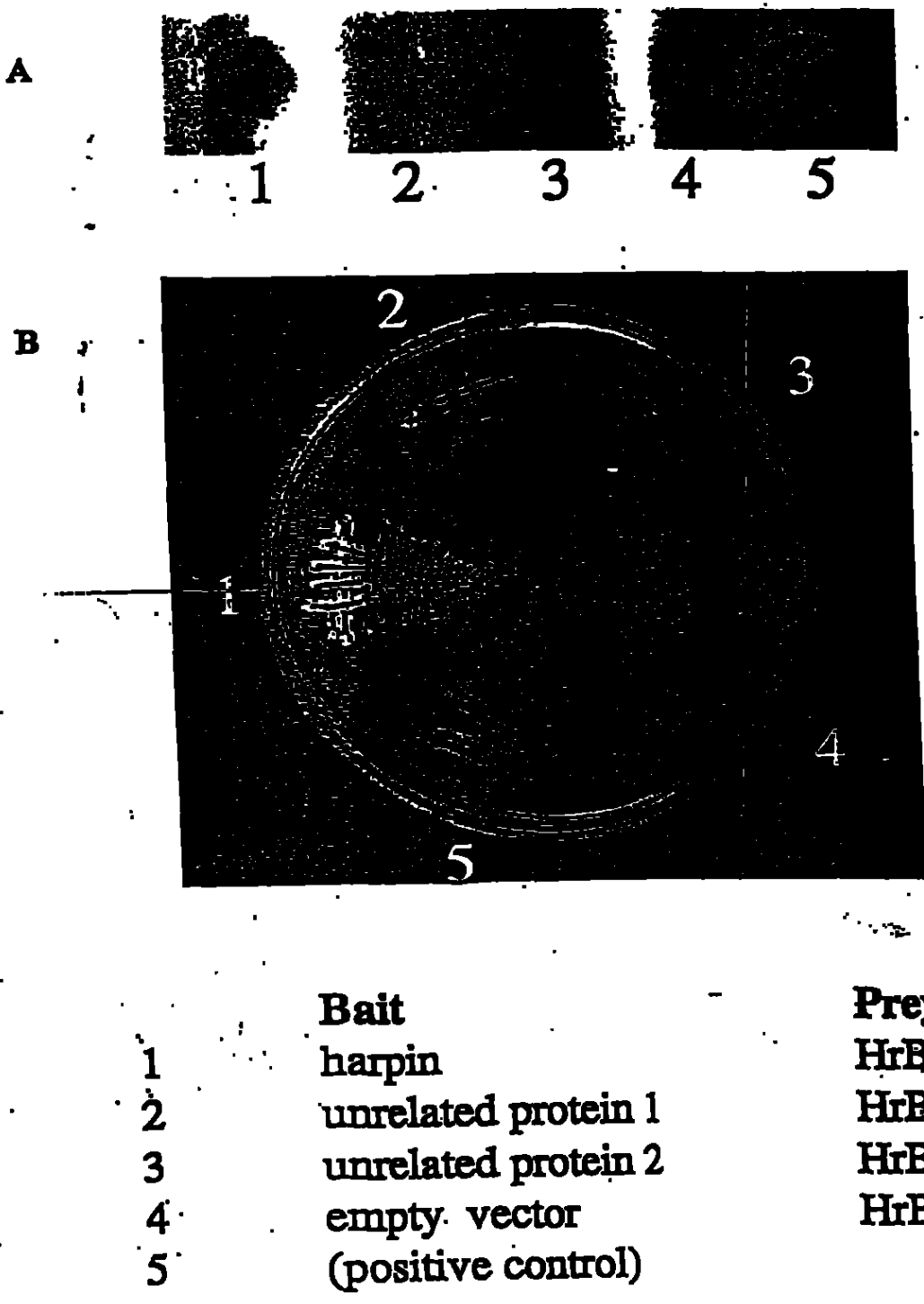
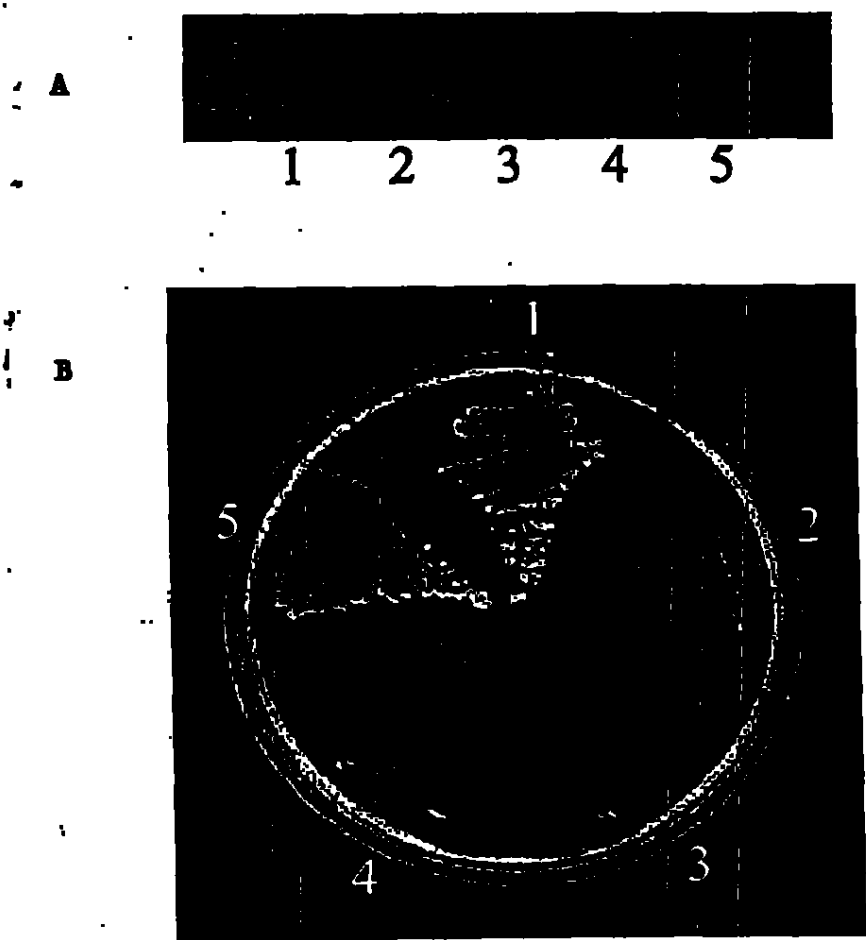


Figure 3

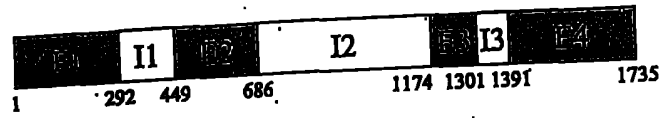
100/25



Bait		Prey
1	HrBP1	harpin
2	HrBP1	empty vector
3	HrBP1	unrelated protein 1
4	HrBP1	unrelated protein2
5	(positive control)	

Figure 4

Figure 5



Gene structure of HrBP1

E: Exon I: Intron



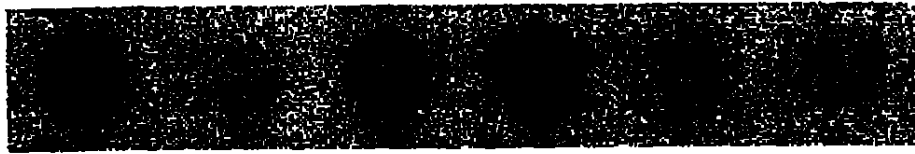
Arabidopsis
soy bean
sun flower
lima bean



Arabidopsis
tobacco
wheat
corn
citrus
cotton
grass
pansy
pepper
potato
tomato

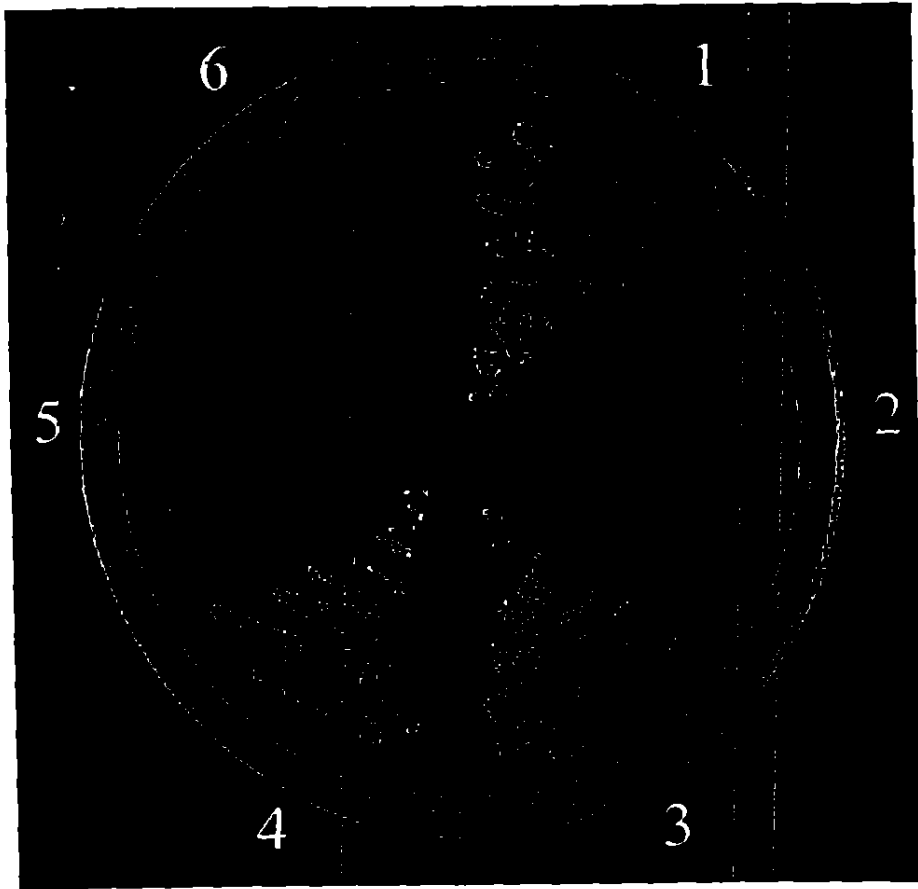
Figure 6

A



1 2 3 4 5 6

B



Bait

Prey

1 Positive control

2 pVJL11

3 hrpN full length

4 hrpN 137-180aa

5 hrpN 210-403aa

6 lexA-lamin

R6

R6

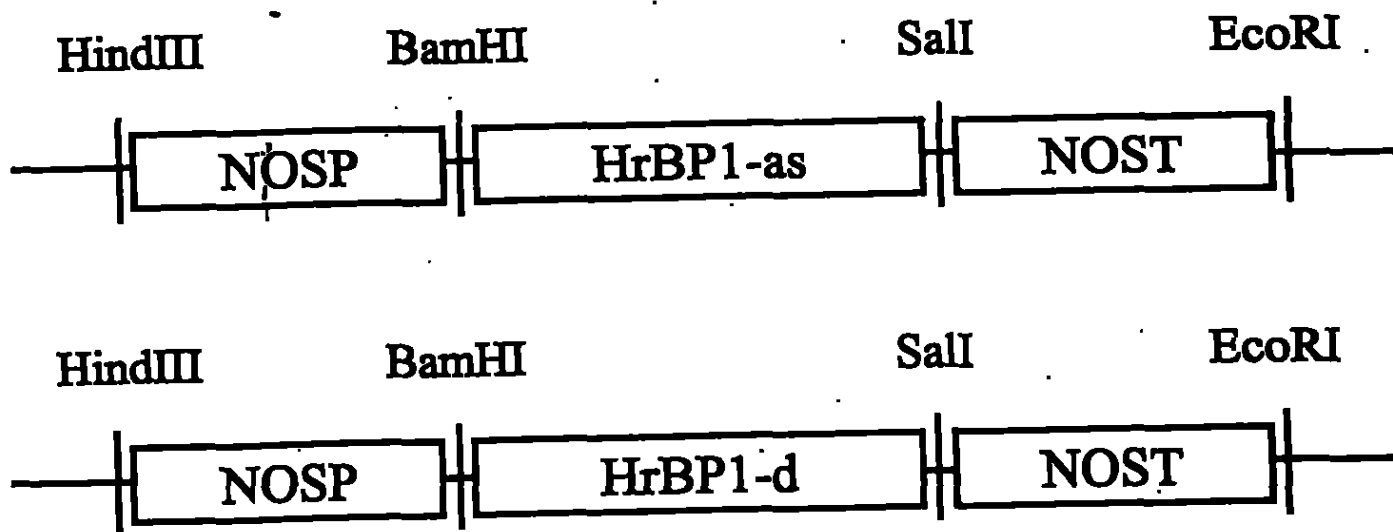
R6

R6

R6

R6

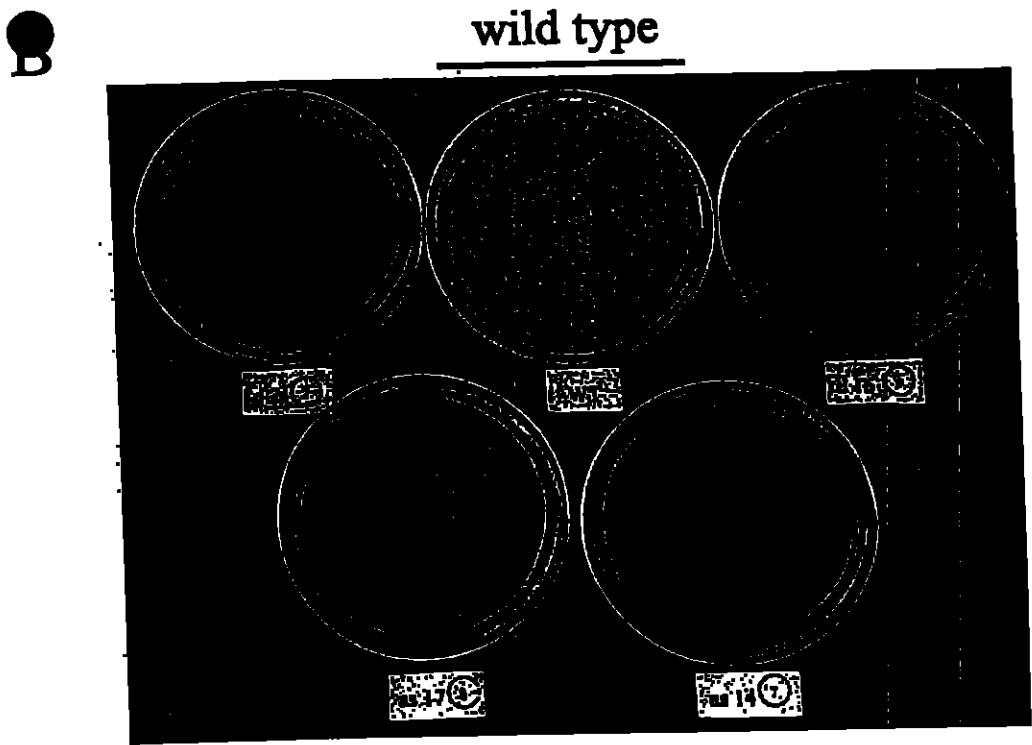
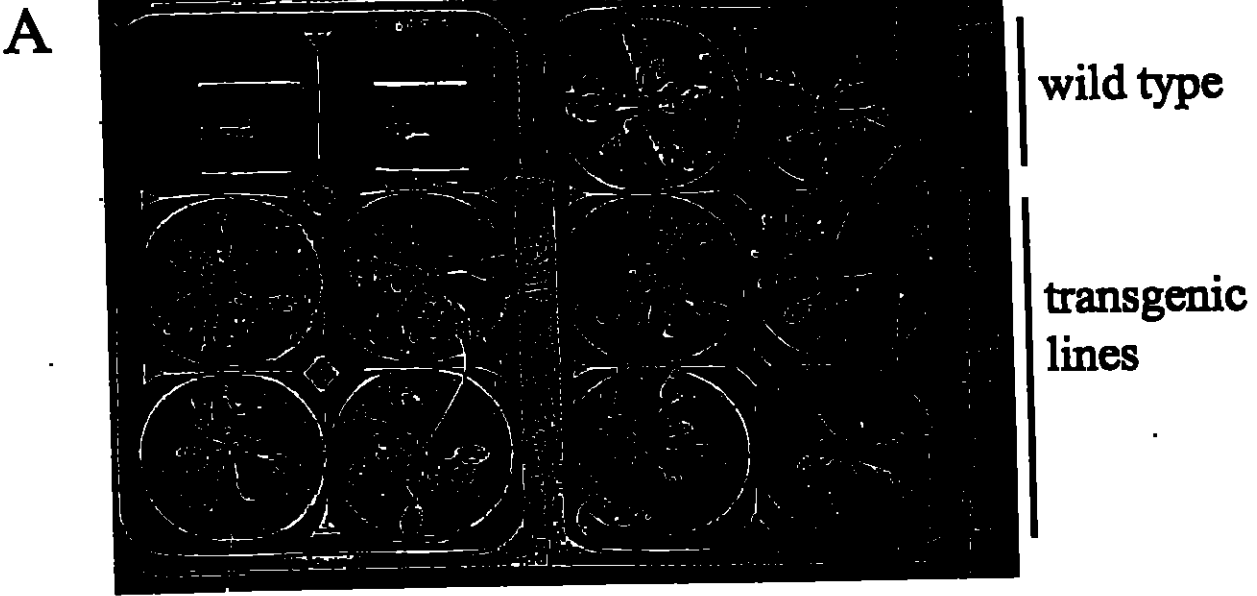
Figure 7



**HrBP1-d: HrBP1 coding region bases 4-650 sense strand
+ 4-500 anti-sense strand**

Figure 8

1052



C

	cfu/cm ²
Wild type	5.5X10 ⁷
d2-2	2.0X10 ⁵
d16-9	2.0X10 ⁵
asl4-7	2.1X10 ⁶
asl7-8	4.1X10 ⁶

Figure 9

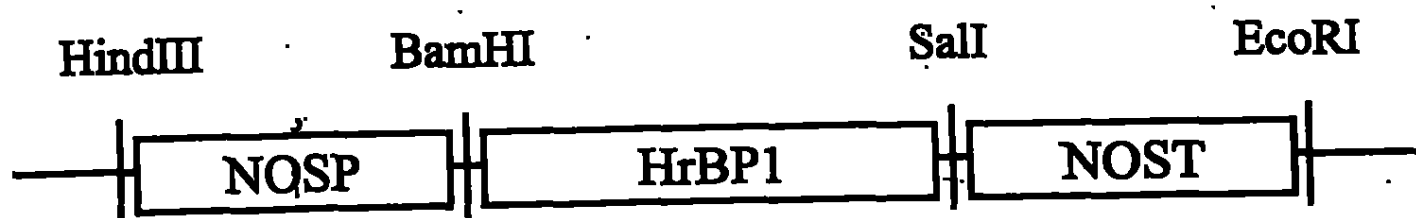


Figure 10

107
12

A



Wild type

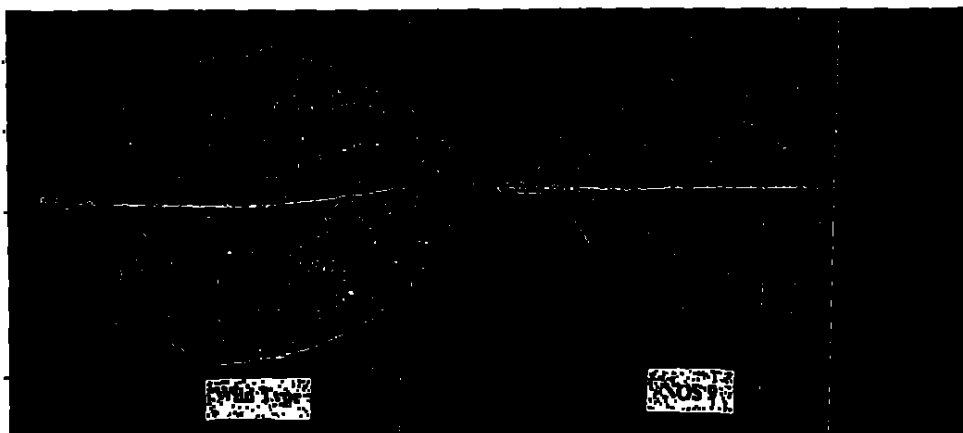
HrBP1 over-expressing
tobacco

B Height of T2 tobacco plants after 52 days
transferring to soil

Wild type	49.5 ± 3.2 cm
Line 1	59.5 ± 3.8 cm
Line 2	61.7 ± 1.9 cm
Line 3	64.3 ± 5.5 cm

Figure 11

A



Wild type

HrBP1 over-expressing line

B

Diameter of Disease Spot

Wild type	2.97 ± 0.49 mm
Line 1	1.97 ± 0.31 mm
Line 2	1.95 ± 0.37 mm
Line 3	2.01 ± 0.33 mm

Figure 12

RESUMEN DE LA DIVULGACION

109

El presente invento se relaciona con una proteína aislada la cual sirve como un receptor en plantas para un inductor de la respuesta hipersensible de patógenos vegetales. También se divulga moléculas de ácidos nucleicos que codifican tales receptores como también vectores de expresión, células hospederas, plantas transgénicas, y semillas de plantas transgénicas que contengan tales moléculas de ácidos nucleicos. Tanto la proteína como el ácido nucleico pueden ser usados para identificar agentes objetivos de células vegetales para realzar o mejorar la receptividad de una planta al tratamiento con un inductor de la respuesta hipersensible y para directamente impartir un mejoramiento del crecimiento vegetal como también resistencia contra enfermedades, insectos y el estrés.

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- Descripción de la invención []
- Dibujos de ser estos pertinentes []
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica del esquema de trazado []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación: 01023525 00000000 Folios: 115
Fecha (AMD): 2001-03-23 17:21:11
Tramite: 002 PATENTES D 1 REGISTRADO/ 111 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@ic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
CARLOS R. OLARTE

REFERENCIA:	Radicación No.	01-23525
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	1384
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar el poder otorgado al abogado que aparezca en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.
- Debe indicarse el lugar de constitución de la sociedad solicitante (Art. 27-c, D 486/00).
- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 28-k, Dec 486/2000).
- Debe allegarse el comprobante de pago por la tasa establecida para la reivindicación de prioridad. En este caso debe presentarse el comprobante de pago de dos (2) solicitudes reivindicadas, habiéndose presentado sólo uno.

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha

10 MAYO 2001

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de las solicitudes cuya prioridad se invoca, copia de las mismas certificadas por la autoridad que las expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de este plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: info@sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia