



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 630**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/29** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**A01N 65/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04021299 .5**

96 Fecha de presentación : **08.08.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **1493817**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2005**

54 Título: **Resistencia contra las plagas de plantas.**

30 Prioridad: **09.08.1996 EP 96401764**  
**16.05.1997 EP 97401101**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.04.2011**

73 Titular/es: **KEYGENE N.V.**  
**Agro Business Park 90, P.O. Box 216**  
**6700 AE Wageningen, NL**

72 Inventor/es: **Vos, Pieter;**  
**Simons, Guus;**  
**Zabeau, Marc y**  
**Wijbrandi, Jelle**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 356 630 T3

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

## DESCRIPCIÓN

## CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a genes de resistencia, a construcciones de ADN, a microorganismos, a células vegetales y a plantas que contienen dichos genes de resistencia. Además, la invención se refiere a plantas genéticamente transformadas que son resistentes frente a plagas de plantas. Además, la solicitud describe sondas y cebadores para la identificación de los genes de resistencia y kits de diagnóstico que contienen dichas sondas y/o cebadores. Finalmente, la invención se refiere a polipéptidos codificados por dichos genes de resistencia y a la utilización de dichos polipéptidos.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los patógenos de las plantas son responsables de pérdidas sustanciales de plantas y productos vegetales debido a la infección de la planta. Las enfermedades de las plantas, como resultado de la infección por patógenos o plagas de las plantas, ocasionan daño a las plantas y/o a los productos vegetales, reducen la producción y el rendimiento, limitan el tipo de plantas que pueden desarrollarse en ciertas áreas geográficas y como resultado ocasionan graves pérdidas (financieras) al agricultor.

Los nematodos parásitos de plantas existen en todo el mundo y la mayoría de ellos vive durante casi toda su vida en la capa superior de la tierra. Aunque se considera que las pérdidas ocasionadas por la alimentación directa de los nematodos de las raíces de las plantas son de pequeña importancia, varias especies, entre ellas los nematodos de los nudos de las raíces que pertenecen a la especie *Meloidogyne*, los nematodos de los quistes que pertenecen a la especie *Heterodera* y a la especie *Globodera* y otros nematodos tales como la especie *Nacobbus*, ocasionan un grave daño y pérdidas económicas en los cultivos. Los nematodos de los nudos de las raíces existen también en todo el mundo pero se encuentran más frecuentemente y en mayor número en áreas con climas más cálidos y en invernaderos. Las especies más importantes de *Meloidogyne* son *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla* y *M. javanica*, de las cuales *M. hapla* se da también en zonas climáticas más templadas.

Existen diferentes medios para controlar los patógenos de las plantas, tales como el cultivo mecánico del suelo, el tratamiento químico con pesticidas, incluyendo nematicidas e insecticidas, o la rotación de cultivos. Sin embargo, para ciertos patógenos de las plantas, especialmente nematodos, estos medios de control son insuficientes para proteger a las plantas de la infección y las enfermedades resultantes. El único medio de control eficaz implica la resistencia de la planta huésped (Russell, 1978, Plant Breeding for pest and disease resistance, Butterworths edit., pág. 485). El desarrollo de cultivos resistentes a los patógenos comunes de las plantas es uno de los principales objetivos de los agricultores hoy en día, con el fin de reducir o finalmente eliminar la considerable necesidad de pesticidas. La carga para el medio ambiente de grandes cantidades de pesticidas inyectados en el suelo o pulverizados sobre los cultivos, árboles, etc., en todo el mundo, resulta cada año más grave. Además, las normas gubernamentales en los países occidentales restringen el uso o incluso prohíben la utilización de ciertos pesticidas. Por lo tanto, la necesidad de plantas que sean resistentes a uno o más de sus patógenos, o que tengan una susceptibilidad reducida a sus atacantes resulta cada vez más urgente. El desarrollo de plantas resistentes es uno de los objetivos importantes de los programas actuales de cultivo de plantas. Los genotipos de plantas susceptibles a patógenos particulares son cruzados con genotipos de plantas resistentes con el fin de introducir el fenotipo resistente en la línea de reproducción.

El daño causado por los nematodos de los nudos de las raíces resulta principalmente de la invasión de las raíces de la planta por larvas, las cuales en una relación compatible con la planta se desarrollan para dar lugar a una hembra reproductora. Después de la invasión, las larvas hacen que las células de las raíces se desarrollen para dar células gigantes de las cuales se alimentan. Después de la infección se forman agallas o nudos en las raíces y las raíces de la planta resultan por otra parte alteradas, se engrosan y atrofian. El sistema de las raíces no funciona bien por tanto para captar el agua y los elementos nutricionales, lo cual daña el crecimiento y desarrollo de la planta. Frecuentemente, el daño a las plantas infectadas es incrementado por hongos parásitos que atacan al tejido de la raíz debilitado. Las plantas infectadas muestran un crecimiento reducido y hojas de color pálido más pequeñas, con frutos diminutos de poca calidad o incluso sin frutos, y tienden a marchitarse en los climas más cálidos (Agrios, 1988, en: Plant Pathology, Academic Press, Inc.). El daño y/o la reducción del rendimiento ocasionados por los nematodos de los nudos de las raíces es considerable en la producción agrícola total mundial. En una plantación individual las pérdidas de producción pueden ser tan elevadas como del 25-50%, o incluso el cultivo puede ser aniquilado.

Los nematodos de los nudos de las raíces de los invernaderos pueden ser controlados mediante esterilización por vapor del suelo o mediante la fumigación del suelo con nematicidas. Bajo condiciones de campo, el control puede lograrse mediante la utilización de nematicidas. Sin embargo, el uso de tales productos químicos, en algunos casos muy persistentes, está siendo cada vez más debatido y en algunos países está incluso prohibido el uso de ciertos nematicidas.

La producción de genotipos genéticamente resistentes es la forma más fiable y eficaz para controlar la enfermedad de los nudos de las raíces. Se ha descrito para varias especies de cultivo la disponibilidad de resistencia dentro del plasma germinal relacionado, por ejemplo, patata, algodón, tabaco, trigo, soja, tomate, berenjena, frijol común y alfalfa. La producción de resistencia está dificultada primeramente por la existencia limitada de genes de resistencia (conocidos) en el plasma germinal disponible; en segundo lugar, en algunas especies de plantas, la existencia de barreras de cruce entre la especie de planta cultivada y la especie relacionada portadora de resistencia, y en tercer

lugar, los ensayos para seleccionar resistencia frente a susceptibilidad a nematodos son laboriosos y por lo regular no fiables. Por lo tanto, la producción de resistencia es muy difícil de conseguir o no se consigue, o si es posible, requiere mucho tiempo.

5 La introducción con éxito de genes de resistencia se ha logrado en el tomate. El gen de resistencia *Mi* (*Meloidogyne incognita*) ha sido introducido en tomates cultivados, *Lycopersicon esculentum*, después del cruce con la especie salvaje relacionada *L. peruvianum* (PI 128657), utilizando un cultivo de embriones. El gen *Mi* confiere resistencia a varias especies de *Meloidogyne* (Fassuliotis, 1991, en: Genetic Improvement of Tomato, Springer Verlag edit.). Se ha descrito que el gen de resistencia *Mi* es un gen dominante monogénico (Gilbert y McGuire, 1956, Proc. Am. Soc. Hortic. Sci., 68, 437-442), y está ubicado en el cromosoma 6 del tomate. También se postula que la región introgresada que comprende el locus *Mi* está involucrada en la concesión de resistencia al áfido de la patata (*Macrosiphum euphorbia*) (Kaloshian y col., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 622-625).

Las plantas han desarrollado un mecanismo complejo de defensa frente al ataque y la infección por patógenos. Hasta la fecha, el mecanismo exacto de su sistema de defensa aún no ha sido averiguado.

15 La resistencia a nematodos en el tomate se expresa después de la penetración. Una vez que la larva juvenil entra en la raíz y se establece en un sitio de alimentación, se desencadena una reacción hipersensible (HR) adyacente a la cabeza del nematodo que tiene como resultado la muerte local de las células del huésped. El nematodo también es afectado adversamente por esta HR y muere (Fassuliotis, 1991, en: Genetic Improvement of Tomato, Springer Verlag edit.). Se desconoce si existe o no un sentido de relación gen por gen (Flor, 1956, Adv. Gen., 8, 29-54) como es frecuentemente el caso en otras relaciones planta-patógeno en las que la resistencia se basa en la incompatibilidad de HR.

20 El aislamiento de genes vegetales sin conocer sus productos génicos es muy laborioso y difícil, debido a los enormes tamaños del genoma de las especies vegetales: por ejemplo, el tomate tiene un tamaño de genoma de 1000 Mb ( $10^9$  pares de bases de ADN nuclear), el maíz tiene un tamaño de genoma de 3000 Mb y el trigo tiene incluso más de  $16 \times 10^9$  pares de bases. La búsqueda de un gen específico entre estos billones de pares de bases solamente es posible cuando, (i) existen suficientes marcadores moleculares estrechamente unidos al gen de interés y (ii) existe un buen material genético disponible (Tanksley y col., 1995, Trends in Genetics, 11, p. 63-68).

25 Aunque se ha descrito el aislamiento de unos cuantos genes de resistencia, ninguno de estos genes de resistencia es capaz de conferir a la planta huésped resistencia a nematodos o a áfidos. Ejemplos de dichos genes de resistencia aislados son: *RPS2* de *Arabidopsis* (resistencia a *Pseudomonas syringae* que expresa avrRpt2), *N* del tabaco (resistencia al virus del mosaico del tabaco), *Cf-9* del tomate (resistencia al patógeno fúngico de las hojas *Cladosporium fulvum* que lleva avr9) y *L<sup>6</sup>* del lino (resistencia a la estirpe fúngica del óxido de las hojas correspondiente) (Dangl, 1995, Cell, 80, 363-366).

30 La presente invención proporciona el primer gen de resistencia a nematodos aislado, y además, proporciona el primer gen de resistencia a áfidos aislado. Además, la presente invención se refiere a un gen de resistencia de doble función que confiere susceptibilidad reducida a nematodos así como a áfidos, y preferiblemente a *Meloidogyne incognita* y *Macrosiphum euphorbiae*, respectivamente.

## RESUMEN DE LA INVENCION

35 La invención se refiere a un ácido nucleico aislado que tiene al menos un 50% de identidad con la secuencia de ADN de la Figura 5 y donde dicho ácido nucleico, cuando es transferido a una planta que es susceptible a una plaga de plantas, es capaz de reducir la susceptibilidad de dicha planta a dicha plaga de plantas.

40 La presente solicitud describe un ácido nucleico que contiene el gen de resistencia *Mi*, el cual cuando está presente y es expresado en una planta es capaz de conferir a dicha planta resistencia contra nematodos y/o áfidos. Además, la solicitud describe el gen de resistencia *Mi* cuya secuencia de ADN está descrita en la presente. La invención también se refiere a un producto génico codificado por el ácido nucleico aislado de la invención. Además, la presente invención se refiere a construcciones de ADN, cósmidos, vectores, cepas bacterianas, células de levadura y células vegetales que contienen el ácido nucleico de la invención. La presente solicitud describe una planta genéticamente transformada, la cual es resistente a un nematodo, siendo dicho nematodo capaz de infectar la planta no transformada. Además, la invención se refiere a un ácido nucleico de la invención que, cuando está presente en una planta, es capaz de conferir a dicha planta resistencia a la infección por plagas de plantas.

45 Finalmente, la solicitud describe oligonucleótidos que corresponden a la secuencia de dicho gen de resistencia o a parte del mismo, y kits de detección que contienen dichos oligonucleótidos.

## DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

50 La Figura 1 muestra un mapa físico de YAC 1/1172, YAC 2/1256 y YAC 1/1084, con un tamaño de 570, 500 y 470 kb, respectivamente. Se indican la posición de los sitios de restricción de *SfiI* y *BssHII* y el tamaño de los fragmentos de restricción. Se indica la ubicación de los diferentes marcadores AFLP en los fragmentos de restricción.

55 La Figura 2 muestra un dibujo esquemático del vector cosmídico binario pJJ04541, el cual es utilizado para construir una biblioteca de cósmidos de YAC 1/546. El plásmido pRK290 (20 kb de tamaño) (Ditta y col.,

1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7347-7351) fue utilizado como vector de inicio. "Tet" se refiere al gen que confiere resistencia a tetraciclina. "LB" indica la secuencia de repetición del límite izquierdo del ADN-T, y "RB" indica la repetición del límite derecho. La secuencia del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor está indicada por "p35S", y "ocs3" indica el extremo 3' de la sintasa de octopina. "NPT" indica fosfotransferasa de neomicina, y "cos" se refiere al sitio cos del bacteriófago lambda que permite el empaquetamiento *in vitro*. "pDBS" indica el poliadaptador de pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.).

La Figura 3A muestra una representación esquemática de la posición detallada de los marcadores AFLP en YAC 1/1172, YAC 2/1256 y YAC 1/1084. La colocación se basa en el contig cosmídico construido para las diferentes regiones definidas.

La Figura 3B muestra una representación esquemática del contig cosmídico de la región que comprende el gen de resistencia *Mi*. Los cósmidos Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18, Mi-01 y Mi-14 están representados por líneas horizontales. Se indica la ubicación de los marcadores AFLP, PM14 y PM25.

La Figura 4 muestra un mapa físico preciso de los cósmidos Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18, Mi-01 y Mi-14 para el enzima de restricción *Pst*I. Se indica el tamaño de los fragmentos de *Pst*I (en kb). El fenotipo *Mi*, según se identificó en un ensayo de enfermedad *in vitro*, de las plantas R<sub>0</sub> que contienen los diferentes cósmidos está indicado en la parte del extremo derecho de la figura. El segmento de ADN del cual se determinó la secuencia de nucleótidos está indicado por una línea doble con una flecha bidireccional.

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos de un segmento de ADN de aproximadamente 9,9 kb alrededor del marcador AFLP, PM14, y una secuencia de aminoácidos deducida del gen de resistencia *Mi*. El codón de inicio (ATG, posición 3263-3265) está subrayado y el codón de terminación (TAG, posición 7109-7111) está doblemente subrayado, mostrando un marco de lectura abierto (ORF1) que codifica un polipéptido de 1257 aminoácidos (Figura 7A). El gen de resistencia *Mi* comprende dos secuencias intrónicas (mostradas en cursiva): un intrón de 1306 nucleótidos desde la posición 1936 hasta la posición 3241 y un intrón de 75 nucleótidos desde la posición 3305 hasta la posición 3379.

Un segundo codón de inicio (ATG, posición 3491-3493), el cual está en marco con el primer codón de inicio, da como resultado un segundo marco de lectura abierto (ORF2) que codifica un polipéptido truncado de 1206 aminoácidos (Figura 7B).

La posición del marcador AFLP, PM14, es desde el nucleótido en posición 6921 (5'-TGCAGGA-3') hasta el nucleótido en posición 7034 (5'-AGATTA-3').

La Figura 6 muestra un mapa físico de los cósmidos Mi-11 y Mi-18 y la secuencia de nucleótidos determinada del cósmido Mi-11. La secuencia está dividida en cuatro contigs: con25 (5618 pb), con10 (898 kb), con62 (2495 pb) y *Mi* (9870 pb). La parte inferior de la figura representa la presencia ("+") o ausencia ("-") de varios fragmentos de PCR, que corresponden a las partes del segmento de ADN de la Figura 5, que están representados como líneas horizontales de diferentes longitudes en el lado derecho de la tabla, en los diferentes fondos genéticos (clon YAC 2/1256, *E. coli* conteniendo el cósmido Mi-11, *A. tumefaciens* conteniendo el cósmido Mi-11, *E. coli* conteniendo el cósmido Mi-18, *A. tumefaciens* conteniendo el cósmido Mi-18, línea E22 de tomate resistente, línea 52201 de tomate susceptible, plantas R<sub>0</sub> transformadas con el cósmido Mi-11 y plantas R<sub>0</sub> transformadas con el cósmido Mi-18).

Secuencia de nucleótidos del cósmido Mi-11 y del cósmido Mi-18. Análisis de diferentes contigs.

#### Figura 7

A: muestra la secuencia de aminoácidos deducida del polipéptido codificado por ORF1.

B: muestra la secuencia de aminoácidos deducida del polipéptido truncado codificado por ORF2.

La Figura 8 muestra una representación esquemática de la estructura del gen de resistencia *Mi*.

La Figura 9 muestra una representación esquemática de la familia del gen de resistencia *Mi*.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

En la presente descripción y en los ejemplos que siguen, se utilizan varios términos. Con el fin de proporcionar un entendimiento claro y consistente de la especificación y las reivindicaciones, incluyendo el alcance que ha de darse a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

- ácido nucleico: molécula de ADN de doble hebra. El ácido nucleico puede ser ADN genómico, ADNc, ADN sintético o cualquier otro ADN;
- oligonucleótido: una molécula de ADN de hebra sencilla corta;
- cebadores: en general, el término cebador se refiere a una molécula de ADN de hebra sencilla que puede iniciar la síntesis del ADN;
- hibridación de un ácido nucleico: un método para detectar secuencias de ADN relacionadas a través de la

- hibridación de ADN de hebra sencilla sobre soportes tales como una membrana de nailon o papeles de filtro de nitrocelulosa. Las moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias de bases complementarias reformarán la estructura de doble hebra si se mezclan en solución bajo condiciones apropiadas. Se formará la estructura de doble hebra entre dos ácidos nucleicos de hebra sencilla complementarios incluso si uno está inmovilizado sobre un soporte. En un procedimiento de hibridación Southern, tiene lugar esta última situación;
- 5
- sonda de hibridación: para detectar una secuencia particular de ADN en el procedimiento de hibridación Southern, una molécula de ADN marcada o sonda de hibridación se hace reaccionar con el ADN fraccionado unido a un soporte tal como una membrana de nailon o un papel de filtro de nitrocelulosa. Las áreas del filtro que llevan secuencias de ADN complementarias a la sonda de ADN marcada quedan marcadas como consecuencia de la reacción de rehibridación. Las áreas del filtro que presentan tal marcaje pueden ser detectadas posteriormente de acuerdo con el tipo de marca utilizado. La sonda de hibridación es producida generalmente por clonaje molecular de una secuencia de ADN específica o sintetizando un oligonucleótido sintético;
  - 10
  - secuencia homóloga: una secuencia que tiene al menos un 50%, preferiblemente un 60%, más preferiblemente un 70%, muy preferiblemente un 80% o incluso un 90% de identidad de secuencias con la secuencia particular, por lo que la longitud de las secuencias que serán comparadas para ácidos nucleicos es generalmente de al menos 120 nucleótidos, preferiblemente de 200 nucleótidos y más preferiblemente de 300 nucleótidos y la longitud de las secuencias que serán comparadas para polipéptidos es generalmente de al menos 40 residuos de aminoácidos, preferiblemente de 65 residuos de aminoácidos y más preferiblemente de 100 residuos de aminoácidos. Alternativamente, una secuencia homóloga se refiere a una secuencia que puede hibridarse bajo condiciones rigurosas a una secuencia particular, y/o a una secuencia de ADN que codifica un polipéptido que tiene sustancialmente las mismas propiedades que el polipéptido codificado por la secuencia de ADN particular, y/o a una secuencia de ADN que codifica un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por la secuencia de ADN particular, y/o a una secuencia de aminoácidos en la que algunos residuos de aminoácidos han sido cambiados con respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido particular sin afectar sustancialmente a las propiedades principales de dicho polipéptido;
  - 15
  - 20
  - 25
  - condiciones rigurosas se refiere a condiciones de hibridación que permiten que una secuencia de ácido nucleico se hibride a una secuencia particular. En general, condiciones muy rigurosas se refiere a las condiciones de hibridación que permiten que una secuencia de ácido nucleico de al menos 50 nucleótidos, y preferiblemente de alrededor de 200 o más nucleótidos, se hibride a una secuencia particular a aproximadamente 65°C en una solución que contiene sal 1 M aproximadamente, preferiblemente SSC 6 x o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable, y lavando a 65°C en una solución que contiene sal 0,1 M aproximadamente, o menos, preferiblemente SSC 0,2 x o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable. Estas condiciones permiten la detección de secuencias que tienen alrededor de un 90% o más de identidad de secuencias. En general, condiciones menos rigurosas se refiere a las condiciones de hibridación que permiten que una secuencia de ácido nucleico de al menos 50 nucleótidos, y preferiblemente de alrededor de 200 o más nucleótidos, se hibride a una secuencia particular a aproximadamente 45°C en una solución que contiene sal 1 M aproximadamente, preferiblemente SSC 6 x o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable, y lavando a temperatura ambiente en una solución que contiene sal 1 M aproximadamente, preferiblemente SSC 6 x o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable. Estas condiciones permiten la detección de secuencias que tengan hasta un 50% de identidad de secuencias. Los expertos en la técnica serán capaces de modificar estas condiciones de hibridación con el fin de identificar secuencias que tengan una identidad que varíe entre el 50% y el 90%;
  - 30
  - 35
  - 40
  - promotor: una región de regulación de la transcripción corriente arriba desde la secuencia codificadora que contiene las secuencias reguladoras requeridas para la transcripción de la secuencia codificadora adyacente e incluye la región 5' no traducida o la llamada secuencia líder de ARNm;
  - 45
  - terminador: una región corriente abajo de la secuencia codificadora que dirige la terminación de la transcripción, también denominada región 3' no traducida, la cual incluye la señal de poli-adenilación;
  - gen de resistencia: un ácido nucleico que comprende una secuencia codificadora como la representada en la Figura 5, o parte de la misma, o cualquier secuencia homóloga o correspondiente;
  - 50
  - nematodo(s): especies de *Meloidogyne*, tales como *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* o *M. javanica*, o cualquier otro genotipo que no sea capaz de infectar un huésped que tenga un gen de resistencia de acuerdo con la invención, tales como, pero no limitándose a, otros nematodos de los nudos de las raíces, tales como *M. hapla*, nematodos quísticos tales como las especies de *Heterodera*, o las especies de *Globodera*, u otros nematodos tales como las especies de *Nacobbus*, insectos tales como el áfido de la patata o cualquier otro patógeno o plaga de las plantas;
  - 55
  - producto de un gen de resistencia: un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como la representada en la Figura 5, o parte de la misma, o cualquier secuencia de aminoácidos homóloga;
  - planta R<sub>0</sub>: regenerante primario procedente de un experimento de transformación, también denominada planta transformada o planta transgénica;

- línea R<sub>1</sub>: la progenie de una planta R<sub>0</sub> autofecundada;
- línea R<sub>2</sub>: la progenie de una planta R<sub>1</sub> autofecundada;
- línea R<sub>1</sub>BC: la progenie de un retrocruzamiento entre una planta R<sub>1</sub> y una planta del genotipo que se utilizó originalmente para el experimento de transformación.

5 En la presente solicitud, hemos podido identificar y aislar el gen de resistencia a *Meloidogyne incognita* (*Mi*). El gen fue clonado a partir de un genotipo de tomate que es resistente a *Meloidogyne incognita*. El gen de resistencia *Mi* aislado de acuerdo con la invención puede ser transferido a una planta huésped susceptible utilizando transformación mediada por *Agrobacterium* o cualquier otro método de transformación conocido, y está implicado en la concesión de resistencia a la planta huésped frente a patógenos vegetales, especialmente nematodos. La planta huésped puede ser el tomate o cualquier otro genotipo que sea infectado por dicho patógeno vegetal.

10 La presente solicitud proporciona también una secuencia de ácido nucleico que contiene el gen de resistencia *Mi*, la cual está representada en la Figura 5.

15 Con el gen de resistencia *Mi*, se tiene un medio de control eficaz frente a patógenos y/o plagas de las plantas, ya que el gen puede ser utilizado para transformar genotipos de plantas susceptibles, produciendo así plantas genéticamente transformadas que tienen una susceptibilidad reducida o que son preferiblemente resistentes a un patógeno o a una plaga de las plantas. En particular, una planta que es transformada genéticamente con el gen de resistencia *Mi* tiene una susceptibilidad reducida a los nematodos de los nudos de las raíces.

20 En una realización preferida, el ácido nucleico aislado de la invención está precedido por una región promotora y seguido por una región de terminación. La región promotora debe ser funcional en células vegetales y, preferiblemente, corresponde a la región promotora nativa del gen de resistencia *Mi*. Sin embargo, debe reconocerse que puede utilizarse cualquier región promotora heteróloga junto con las secuencias codificadoras, siempre que sea funcional en células vegetales. Preferiblemente, se utiliza un promotor constitutivo, tal como el promotor 35S del CaMV o los promotores de ADN-T, todos bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, una región de terminación adecuada debe ser funcional en células vegetales todas bien conocidas por los expertos en la técnica.

25 Además, la invención se refiere a un producto génico que está codificado por el ácido nucleico de acuerdo con la invención y que tiene una secuencia de aminoácidos deducida que tiene al menos un 50% de identidad con la secuencia de proteínas de la Figura 7A. Además, el producto del gen de resistencia *Mi* o un polipéptido truncado como el proporcionado en la Figura 7B, puede ser utilizado para producir anticuerpos contra el mismo, anticuerpos que pueden ser utilizados para la detección de la presencia del producto del gen de resistencia *Mi*.

30 El gen de resistencia *Mi* puede ser utilizado para el diseño de oligonucleótidos que sean complementarios a una hebra de la secuencia de ADN según se describe en la Figura 5, o a parte de la misma, que pueden ser utilizados como sondas de hibridación, siendo marcados por consiguiente para permitir la detección, para someter a selección bibliotecas de ADN genómico o de ADNc por genes homólogos. Se describen también secuencias homólogas que pueden hibridarse a la sonda bajo condiciones de hibridación rigurosas, y que codifican un producto génico que está involucrado en la concesión de susceptibilidad reducida o resistencia a una planta frente a un patógeno vegetal que normalmente infecta dicha planta.

35 En otro aspecto, se diseñan oligonucleótidos basados en la secuencia del gen de resistencia *Mi*, de tal manera que pueden ser utilizados como sondas de hibridación en el análisis Southern. Estas sondas pueden ser utilizadas como marcadores moleculares para distinguir genotipos de plantas que tengan el gen de resistencia y genotipos de plantas que carezcan del gen de resistencia. Dicha sonda puede ser utilizada como una herramienta adicional en la selección. En una realización preferida de la invención, los oligonucleótidos son diseñados sobre la base de la secuencia del gen de resistencia *Mi*, de tal manera que pueden ser utilizados como cebadores en una reacción de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por lo que la formación de un producto de amplificación indica la presencia del gen de resistencia *Mi* en cierto genotipo vegetal. Dichos cebadores dirigen la amplificación de fragmentos polimórficos, llamados marcadores moleculares, los cuales están estrechamente ligados al gen de resistencia *Mi*. En una realización preferida, dichos cebadores son utilizados en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción para identificar marcadores AFLP, los cuales están estrechamente ligados al gen de resistencia *Mi*. La solicitud también describe kits de diagnóstico, que contienen oligonucleótidos, para la detección de la presencia o ausencia del gen de resistencia *Mi* dentro de un genotipo bajo estudio. Dicho kit de diagnóstico elimina la utilización de un análisis laborioso de enfermedades para seleccionar genotipos que tengan o no el gen de resistencia.

40 Además, la invención se refiere a construcciones de ADN que contienen un ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras funcionales en células vegetales; dicho ácido nucleico puede ser ADN genómico, ADNc, ADN sintético o ADN de cualquier otro origen. Dichas secuencias reguladoras son homólogas o heterólogas a las secuencias codificadoras del ácido nucleico de la invención.

55 La invención se refiere también a construcciones de ADN que contienen las secuencias reguladoras, y más preferiblemente la región del promotor del gen de resistencia *Mi* junto con una secuencia de un gen estructural heteróloga a dichas secuencias reguladoras.

La invención también se refiere a un vector de ADN que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Los vectores adecuados pueden ser vectores de clonaje, vectores de transformación, vectores de expresión, etc..., los cuales son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Además, están dentro del ámbito de la invención células que llevan un vector que contiene un ácido nucleico de la invención. Además, están dentro del ámbito de esta invención células que llevan una construcción de ADN de acuerdo con la invención.

En otra realización de la invención, el ácido nucleico de la invención puede ser transferido, utilizando técnicas de transformación generalmente conocidas, a sistemas heterólogos, tales como, pero no limitándose a, melón, tabaco, *Arabidopsis thaliana*, patata, remolacha, colza, pepino, pimienta, berenjena. Un sistema heterólogo se refiere a una especie de planta que es diferente de la especie de planta de la que se aisló el ácido nucleico de la invención.

El ácido nucleico de la invención según es proporcionado en la presente invención tiene numerosas aplicaciones de las cuales algunas están descritas en la presente, pero las mismas no limitan el ámbito de la invención.

La presente invención será descrita adicionalmente con detalle a la vista del aislamiento del gen de resistencia *Mi* presente en líneas de tomate que son resistentes a los nematodos de los nudos de las raíces. Para el aislamiento del gen de resistencia *Mi*, hemos utilizado una estrategia de clonaje basada en el mapa (clonaje posicional), que comprende las etapas siguientes:

- (1) identificación de los marcadores moleculares ligados al gen de resistencia *Mi*,
- (2) construcción de una biblioteca genómica de YAC de peso molecular alto,
- (3) creación de mapas físicos de los marcadores moleculares en los clones de YAC y construcción de contigs de YAC,
- (4) construcción de una biblioteca de cósmidos de los clones de YAC que lleven los marcadores moleculares unidos,
- (5) creación de mapas físicos precisos y construcción de contigs cosmídicos,
- (6) caracterización genética de mutantes de tomate susceptibles a los nematodos de los nudos de las raíces,
- (7) transformación de plantas susceptibles con los cósmidos que forman el contig,
- (8) análisis de la complementación.

Para la identificación de marcadores moleculares, hemos utilizado la tecnología de amplificación de fragmentos de restricción selectiva, de aquí en adelante también denominada tecnología AFLP<sup>TM</sup>, la cual amplifica aleatoriamente un subgrupo de fragmentos de ADN de una mezcla compleja de muchos fragmentos de ADN y dichos fragmentos amplificados generan huellas que pueden ser analizadas. En general, el ADN total de diferentes genotipos de la misma especie de planta es sometido a la tecnología AFLP y se comparan las diferentes huellas de AFLP obtenidas de los diferentes genotipos. Los fragmentos que están presentes en un genotipo y ausentes en otro genotipo son fragmentos polimórficos y se denominan marcadores AFLP. La selectividad de las reacciones AFLP se obtiene utilizando nucleótidos selectivos aleatoriamente seleccionados en el extremo 3' de los cebadores de PCR inmediatamente adyacentes a los nucleótidos del sitio del enzima de restricción. En una selección por AFLP, el ADN que va a ser estudiado es sometido a diferentes combinaciones de cebadores. La cantidad total de los diferentes cebadores que puede ser utilizada está determinada por el número de nucleótidos selectivos que son añadidos al extremo 3' (4 cebadores con 1 nucleótido selectivo, 16 cebadores con 2 nucleótidos selectivos, 64 cebadores con 3 nucleótidos selectivos). Si se utilizan dos enzimas de restricción diferentes, hay entonces una cantidad doble de cebadores. Esos cebadores pueden ser utilizados en una combinación diferente. Si se utilizan todas las combinaciones posibles en una selección por AFLP, todos los fragmentos presentes deben haber sido amplificados con una de las combinaciones de cebadores (Zabeau y Vos, EP 0534858).

Para la identificación de marcadores AFLP ligados al gen de resistencia *Mi*, diferentes líneas de tomate fueron sometidas a una selección por AFLP. En una primera etapa, se analizaron dos grupos de líneas casi isogénicas para determinar resistencia a nematodos frente a susceptibilidad mediante la formación de huellas de AFLP utilizando los siguientes cebadores:

Cebadores de *Pst*I 5'-GACTGCGTACATGCAGNN-3'

Cebadores de *Mse*I 5'-GATGAGTCCTGAGTAANNN-3'

Las Ns indican los nucleótidos selectivos variables. En la selección por AFLP se utilizaron todos los 16 cebadores posibles para el cebador de *Pst*I y los 64 cebadores posibles para el cebador de *Mse*I en los dos grupos de líneas casi isogénicas, dando un total de 16 x 64 = 1024 combinaciones de cebadores ensayadas. Después del análisis de todas las huellas de AFLP, se identificaron un total de 30 marcadores AFLP candidatos ligados al gen de resistencia

*Mi*. Estos marcadores candidatos fueron posteriormente ensayados en un panel de líneas de tomate resistentes a nematodos y susceptibles a nematodos para la confirmación y determinación de la distancia de la unión al locus *Mi*. El gen de resistencia *Mi* fue introgresado en el tomate cultivado en 1944 a partir de *Lycopersicon peruvianum*. Las líneas de tomate resistentes a nematodos modernas han sido sometidas a numerosos ciclos de cruce, esperando obtener como resultado una región pequeña introgresada de *Lycopersicon peruvianum* con el gen de resistencia *Mi*. Se espera que el análisis de los marcadores AFLP candidatos en estos genotipos de tomate modernos sea un buen ensayo para determinar la unión próxima al locus *Mi*. Un panel de 7 genotipos de tomate resistentes y 11 genotipos de tomate susceptibles fue analizado con los marcadores AFLP candidatos. Parecía que un total de 20 marcadores AFLP estaban presentes en todas las líneas resistentes y ausentes en todas las líneas susceptibles y se denominaron marcadores AFLP ligados a *Mi*.

Posteriormente, cuatro de los marcadores AFLP fueron sometidos a selección en una biblioteca genómica de alto peso molecular. El clonaje de segmentos muy grandes de ADN como cromosomas artificiales grandes en levaduras se ha convertido en una etapa esencial para el aislamiento de genes mediante clonaje posicional. La capacidad de clonaje del vector YAC permite el aislamiento de fragmentos de ADN de hasta un millón de pares de bases de longitud. La línea de tomate *Lycopersicon esculentum* E22, homocigota para el locus *Mi*, fue utilizada como una fuente de ADN para construir una biblioteca de YAC. Obtuvimos una biblioteca de YAC conteniendo 3840 clones con un tamaño de inserto promedio de 520 kb, representando aproximadamente 2,2 equivalentes genómicos del genoma del tomate. Se obtuvieron tres clones de YAC positivos después de la selección por AFLP con los marcadores AFLP ligados a *Mi*: 1/1084, 1/1172 y 2/1256. Posteriormente, se determinó la presencia de todos los marcadores AFLP ligados a *Mi* en los 3 clones de YAC. Todos los marcadores parecían estar presentes en uno o más de los 3 clones de YAC, lo cual permitió una primera colocación de los diferentes marcadores AFLP ligados a *Mi*. Los datos de AFLP indicaban que los tres clones de YAC constituían un contig solapante de aproximadamente 1,4 Mb (ver la Figura 1).

Para determinar el tamaño físico del locus *Mi* que contenía los marcadores AFLP ligados a *Mi* y que estaba contenido en los clones de YAC 1/1084, 1/1172 y/o 2/1256, se construyó un mapa de restricción de gran alcance del contig de YAC. Éste definía un segmento de ADN que contenía el locus *Mi* de aproximadamente 700 kb en el cual estaban ubicados todos los marcadores AFLP ligados a *Mi* (ver la Figura 1).

Un tamaño de 700 kb es aún demasiado grande para la localización directa del gen de resistencia *Mi*. Dichos insertos grandes no pueden ser transformados en células vegetales directamente. Por lo tanto, se construyó una biblioteca de cósmidos de la cepa de levadura que contenía YAC 1/1172 y se construyó una biblioteca de cósmidos de la cepa de levadura que contenía YAC 2/1256 utilizando vectores cosmidicos que son adecuados para la transformación mediada por *Agrobacterium*. El tamaño de este vector cosmidico binario viene a ser de 29 kb y se muestra esquemáticamente en la Figura 2. La capacidad de clonaje de este vector cosmidico binario, utilizando un extracto de empaquetamiento del fago lambda, está dentro del rango de 9 a 24 kb. Se obtuvieron dos bancos de aproximadamente 250.000 clones cosmidicos cada uno a partir del ADN de levadura fraccionado por tamaños. Los bancos de cósmidos fueron sometidos a selección por hibridación de colonias utilizando como sondas fragmentos de restricción marcados de los YACs. Se identificaron clones de cósmidos positivos y además, los cósmidos fueron agrupados en siete regiones definidas que cubrían la región *Mi*.

En la siguiente etapa, se determinó la huella del grupo de cósmidos de las siete regiones definidas utilizando la amplificación de fragmentos de restricción para determinar su orden relativo. Pudo construirse un contig cosmidico que cubría un segmento de ADN de aproximadamente 700 kb. Posteriormente, se determinó la presencia de los marcadores AFLP ligados a *Mi* en este contig cosmidico. Se obtuvo un mapa físico del segmento de ADN que contenía el gen de resistencia *Mi* con las posiciones de los diferentes marcadores AFLP ligados a *Mi* (ver la Figura 3).

Un total de 96 cósmidos solapantes constituían conjuntamente el segmento de ADN que contenía el gen de resistencia *Mi*. El análisis de complementación para identificar el gen de resistencia *Mi* con tal grupo grande de cósmidos es una tarea muy laboriosa. Por lo tanto, la posición del gen de resistencia *Mi* en el contig cosmidico fue determinada utilizando líneas de tomate mutantes. Estas líneas mutantes son miembros de una familia que se originó de un ancestro común y contienen un genotipo *Mi* de tipo salvaje (resistente a nematodos) pero un fenotipo mutante susceptible a nematodos. Después del análisis con el grupo de marcadores AFLP ligados a *Mi* en un gran número de estas líneas mutantes, tres marcadores AFLP ligados a *Mi* parecían estar ausentes en la mayoría de los mutantes. Estos marcadores AFLP, por lo tanto, mostraban una buena correlación entre el genotipo *Mi* de AFLP y el fenotipo *Mi*, en contraste con los demás 17 marcadores AFLP. Dos de estos marcadores AFLP, PM14 y PM25, eran adyacentes, y se asumió que la región alrededor de estos marcadores era la posición más probable para el gen de resistencia *Mi*. Un grupo de 6 cósmidos solapantes que definían un segmento de ADN de aproximadamente 50 kb alrededor de los marcadores AFLP PM14 y PM25, fue seleccionado para el análisis de complementación (ver la Figura 4).

La etapa final en la identificación del gen de resistencia *Mi* mediante clonaje posicional es la complementación del fenotipo susceptible correspondiente. Los 6 cósmidos de la región de *Mi* candidata fueron introducidos en *Agrobacterium tumefaciens* mediante transferencia por conjugación en apareamiento triparental. La presencia del cósmido en las cepas de *A. tumefaciens* fue determinada comparando varios patrones de enzimas de restricción, así como huellas de ADN de las cepas de *A. tumefaciens* con la cepa de *E. coli* que contenía el cósmido. Solamente aquellos cultivos de *A. tumefaciens* que albergaban un cósmido con el mismo patrón de ADN que el cultivo de *E. coli* correspondiente fueron utilizados para transformar una línea de tomate susceptible. Una línea de tomate susceptible fue transformada con los cósmidos Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18, Mi-01 y Mi-14 utilizando métodos estándar de

transformación.

Raíces de plantas R<sub>0</sub> transformadas cultivadas *in vitro* fueron analizadas para determinar síntomas de enfermedad con el fin de identificar los cósmidos con el gen de resistencia. Explantes de raíces fueron transferidos a un medio solidificado en placas Petri e inoculados con diez agallas de un cultivo axénico de nemátodos del nematodo de los nudos de la raíz *Meloidogyne incognita*. Los síntomas de enfermedad fueron valorados seis semanas después de la inoculación. Una planta transgénica es considerada resistente cuando no es visible ninguna agalla o solamente una agalla en el cultivo de su raíz. Una planta transgénica es considerada susceptible cuando al menos dos agallas han sido inducidas en el cultivo de su raíz. Las observaciones del ensayo de enfermedad *in vitro* revelaron que dos cósmidos fueron capaces de complementar el fenotipo susceptible. La presencia del marcador AFLP PM14 en plantas R<sub>0</sub> resistentes indicaba que el inserto genómico presente en los cósmidos Mi-11 y Mi-18 estaba también presente en las plantas R<sub>0</sub> y estaba involucrado en la concesión de resistencia frente a *Meloidogyne incognita* a las plantas R<sub>0</sub>.

Los regenerantes primarios (plantas R<sub>0</sub>) de los experimentos de transformación fueron cultivados en el invernadero para que dieran semillas con el fin de obtener líneas R<sub>1</sub>, las cuales fueron analizadas para determinar síntomas de enfermedad. El ensayo de enfermedad se realizó en los plantones. Para esto, se sembraron las semillas o se transfirieron plántulas pequeñas con raíz a tierra infectada con *Meloidogyne incognita* y se valoraron los síntomas de enfermedad de 4 a 8 semanas después de la inoculación. Las plantas se consideran resistentes cuando son visibles tres o menos agallas en las raíces. Las plantas se consideran susceptibles cuando se forman más de tres agallas en las raíces. Las observaciones del ensayo de enfermedad *in vivo* revelaron que las plantas R<sub>0</sub> resistentes correspondían a los transformantes con el cósmido Mi-11.

Con el fin de confirmar la integración estable del gen de resistencia *Mi* en el genoma de las plantas R<sub>0</sub> transgénicas, las plantas resistentes de las líneas R<sub>1</sub> fueron autofecundadas y cultivadas en el invernadero para que dieran semillas con el fin de obtener líneas R<sub>2</sub>. Los plantones de las líneas R<sub>2</sub> fueron sometidos a un ensayo de enfermedad de nemátodos *in vivo*. Los resultados obtenidos indicaban la herencia estable del gen de resistencia *Mi*.

Finalmente, los insertos de los cósmidos Mi-11 y Mi-18 fueron caracterizados adicionalmente. El análisis de secuenciación reveló un marco de lectura abierto grande (ORF2) de 3621 nucleótidos. La secuencia de ADN se presenta en la Figura 5.

La secuencia de ADN conteniendo el gen de resistencia *Mi* se sometió posteriormente a estudios de mapeo de los transcritos con el fin de determinar la existencia de secuencias intrónicas. Estos estudios de mapeo de los transcritos fueron realizados de acuerdo con métodos generalmente conocidos, mediante los cuales las secuencias de ADN genómico son comparadas con secuencias de ADNc. La comparación de secuencias de ADNc y secuencias genómicas reveló la existencia de dos secuencias intrónicas en el gen de resistencia *Mi*. Un intrón de 1306 nucleótidos está ubicado desde el nucleótido en posición 1936 al 3241 y un segundo intrón de 75 nucleótidos está ubicado desde el nucleótido en posición 3305 al 3379, según está representado en la Figura 5. Se postuló que la posición del sitio de inicio de la transcripción estaba en o corriente arriba del nucleótido 1880. El primer codón de inicio ATG está localizado en la posición nucleotídica 3263, que está 52 nucleótidos corriente arriba del segundo intrón, dando un marco de lectura abierto grande (ORF1) que codifica un polipéptido de 1257 aminoácidos (Figura 7A).

Las búsquedas de homología han mostrado que los polipéptidos de acuerdo con la invención pertenecen a la clase LRR de las proteínas de resistencia de las plantas (Staskawicz y col., 1995, Science, 268, 661-667). Además, la proteína puede ser dividida en cuatro regiones designadas A a D: la región A comprende una gran cantidad de residuos de leucina, la región B comprende un motivo de un sitio de unión a nucleótidos, la región C es la región LRR que contiene 13 repeticiones con la siguiente secuencia consenso:

a--a-NL-L-a---a-a/S--- (Jones y Jones, 1997, Advances in Botanical Research, 24, 89-167) y la región D no revela homología con ninguna proteína conocida.

Para la identificación y el aislamiento de secuencias homólogas que están dentro del alcance de la presente invención, se sometieron a selección bibliotecas genómicas y de ADNc con la secuencia codificadora del gen de resistencia *Mi* como sonda bajo condiciones de hibridación rigurosas. Los clones positivos fueron aislados y utilizados para el análisis de complementación.

Se realizaron hibridaciones de transferencia Southern en el contig de YAC con un fragmento de *Pst*I interno de la secuencia codificadora del gen de resistencia *Mi*. Se pudieron identificar tres regiones homólogas adicionales: dos en YAC 1/1172 y una en YAC 1/1084. Cada región comprende de 2 a 3 homólogos de *Mi* indicativos del hecho de que la familia del gen *Mi* está compuesta por 10 a 12 miembros aproximadamente.

Sorprendentemente, los ensayos de enfermedad por áfidos revelaron que las plantas R<sub>0</sub>, transformadas con el cósmido Mi-11, son resistentes a *Meloidogyne incognita* así como resistentes a *Macrosiphum euphorbiae*, indicando que el inserto de genoma presente en el cósmido Mi-11 está involucrado en el hecho de conferir a las plantas R<sub>0</sub> resistencia a nemátodos, además de estar involucrado en el hecho de conferir a las plantas R<sub>0</sub> resistencia a áfidos.

Con el fin de confirmar la herencia de la resistencia a áfidos, (i) las líneas de tomate R<sub>1</sub> previamente obtenidas que fueron derivadas de los transformantes con el cósmido Mi-11 resistentes a nemátodos, (ii) las

líneas R<sub>2</sub> derivadas de plantas R<sub>1</sub> resistentes a nematodos autofecundadas, y (iii) las líneas R<sub>1</sub>BC obtenidas de plantas R<sub>1</sub> resistentes a nematodos retrocruzadas con la línea de tomate susceptible 52201, fueron también analizadas para determinar su resistencia frente a *M. euphorbiae*. Los resultados obtenidos indicaban la herencia de la resistencia a áfidos.

Se utilizó el cósmido Mi-11 para la transformación de genotipos susceptibles a nematodos de tabaco y patata, de acuerdo con los métodos generales de transformación conocidos. Raíces de plantas de tabaco y patata R<sub>0</sub> transformadas cultivadas *in vitro* fueron analizadas para detectar síntomas de enfermedad según se describió previamente en la presente. Las observaciones del ensayo de enfermedad en los cultivos de raíces de las plantas transformadas, indicaron que el cósmido está implicado en el hecho de conferir a las plantas transformadas una susceptibilidad reducida a nematodos. El gen de resistencia tiene un efecto reductor de la susceptibilidad de una especie de planta heteróloga a nematodos, preferiblemente a las especies de *Meloidogyne*, especialmente a *Meloidogyne incognita*.

Además, también se analizaron transformantes de tabaco para determinar su resistencia a áfidos, y pudieron identificarse plantas R<sub>0</sub> resistentes.

El gen de resistencia tiene una doble función y tiene efecto en los sistemas heterólogos.

El cósmido Mi-11 fue depositado el 5 de Agosto de 1996 como plásmido pKGMi-11 en el Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn, Países Bajos, bajo el número de depósito CBS 822.96.

El cósmido Mi-18 fue depositado el 5 de Agosto de 1996 como plásmido pKGMi-18 en el Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn, Países Bajos, bajo el número de depósito CBS 821.96.

Los siguientes ejemplos proporcionarán una ilustración adicional de la presente invención, la cual sin embargo no está limitada a estos ejemplos.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: ENSAYO DE ENFERMEDAD

Un cultivo axénico del nematodo de los nudos de la raíz *Meloidogyne incognita* se mantuvo sobre raíces estériles de la variedad de tomate MoneyMaker. Los cultivos de las raíces se desarrollaron en un medio B5 solidificado (Gamborg y col., 1968, Experimental Cell Research, 50, 151-158) con un 2% de sacarosa y sin hormonas.

Explantos de las raíces (1-5 cm), derivados de plantas de tomate transgénicas cultivadas *in vitro*, se transfirieron al medio B5 solidificado mencionado anteriormente para iniciar los cultivos de las raíces. Al mismo tiempo, cada explante de raíz fue inoculado con 10 agallas del cultivo axénico de nematodos. Las agallas se colocaron a pocos centímetros del explante de raíz. Las placas Petri con las raíces y las agallas se incubaron en la oscuridad a 25°C. Después de cuatro a seis semanas, se determinó el nivel de infección contando el número de agallas formadas en los cultivos de raíces.

La evaluación para determinar la resistencia/susceptibilidad a *M. incognita* fue como sigue:

Una planta transgénica fue considerada resistente cuando ninguna agalla o menos de dos agallas fueron visibles en el cultivo de sus raíces. Una planta transgénica fue considerada susceptible cuando por lo menos dos agallas fueron inducidas en el cultivo sus raíces.

### EJEMPLO 2: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES AFLP LIGADOS A UN SEGMENTO DE ADN QUE CONTENÍA EL GEN DE RESISTENCIA *Mi*

#### Líneas de tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Un total de 9 líneas de tomate resistentes a *Meloidogyne incognita* y 13 líneas de tomate susceptibles a *M. incognita* fueron utilizadas para identificar marcadores AFLP. Inicialmente, se realizó la selección de AFLP en dos grupos de líneas casi isogénicas 83M-R (resistente) y 83M-S (susceptible), y Motelle (resistente) y Mobox (susceptible). Los marcadores candidato que resultaron de esta primera selección fueron confirmados mediante una segunda selección en 7 líneas resistentes a *M. incognita* y en 11 líneas susceptibles a *M. incognita*.

Dos grupos de líneas casi isogénicas:

1.	83M-R	resistente	De Ruiter Zonen C.V. Bergschenhoek, Países Bajos (de aquí en adelante "De Ruiter")
2.	83M-S	susceptible	De Ruiter
3.	Motelle	resistente	INRA, Montfavet, Francia
4.	Mobox	susceptible	INRA, Montfavet, Francia

Las 7 líneas resistentes a *M. incognita* y las 11 líneas susceptibles a *M. incognita* para confirmación:

	5.	DR30	resistente	De Ruiter
	6.	DR17	resistente	De Ruiter
	7.	E22	resistente	Enza Zaden, de Enkhuizen Zaadhandel B.V. Enkhuizen, Países Bajos (de aquí en adelante "Enza Zaden")
5	8.	E1	resistente	Enza Zaden
	9.	DR6	resistente	De Ruiter
	10.	DR10	resistente	De Ruiter
	11.	1872	resistente	Royal Sluis B.V., Enkhuizen, Países Bajos (de aquí en adelante "Royal Sluis")
10	12.	MoneyMaker	susceptible	Agricultural University Wageningen
	13.	DR12	susceptible	De Ruiter
	14.	DR23	susceptible	De Ruiter
	15.	GT	susceptible	De Ruiter
15	16.	RZ3	susceptible	Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V., De Lier, Países Bajos (de aquí en adelante "Rijk Zwaan")
	17.	RZ5	susceptible	Rijk Zwaan
	18.	E3	susceptible	Enza Zaden
	19.	E7	susceptible	Enza Zaden
	20.	E16	susceptible	Enza Zaden
20	21.	RS1	susceptible	Royal Sluis
	22.	RS2	susceptible	Royal Sluis

### Aislamiento y modificación del ADN

El ADN total de tomate de las 22 líneas descritas anteriormente fue aislado de hojas jóvenes según está descrito por Bernatzki y Tanksley (Theor. Appl. Genet., 72, 314-321). El rendimiento típico fue de 50-100 µg de ADN por gramo de material de hoja fresco. El ADN molde para el análisis por AFLP con la combinación de enzimas *Pst*I-*Mse*I fue preparado según está descrito por Zabeau y Vos (Solicitud de Patente Europea, EP 0534858), y se describe a continuación brevemente:

Se incubaron 0,5 µg de ADN de tomate durante 1 hora a 37°C con 5 unidades de *Pst*I y 5 unidades de *Mse*I en 40 µl de Tris.HAc 10 mM pH 7,5, MgAc 10 mM, KAc 50 mM, DTT 5 mM, 50 ng/µl de BSA. A continuación, se añadieron 10 µl de una solución que contenía 5 pmoles de adaptadores de *Pst*I, 50 pmoles de adaptadores de *Mse*I, 1 unidad de ADN-ligasa de T4, ATP 1 mM en Tris.HAc 10 mM pH 7,5, MgAc 10 mM, KAc 50 mM, DTT 5 mM, 50 ng/µl de BSA, y se continuó la incubación durante 3 horas a 37°C. Los adaptadores se representan a continuación:

La estructura del adaptador de *Pst*I era:

5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3'

3'-CATCTGACGCATGT-5'

La estructura del adaptador de *Mse*I era:

5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

3'-TACTCAGGACTCAT-5'

Los adaptadores fueron preparados añadiendo cantidades equimolares de ambas hebras; los adaptadores no estaban fosforilados. Después de la ligadura, la mezcla de reacción se diluyó a 500 µl con Tris.HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 8,0, y se almacenó a -20°C. La mezcla de reacción diluida es referida además como ADN molde.

### Reacciones de AFLP

Los cebadores utilizados para la selección por AFLP se presentan a continuación:

45 Cebadores de *Pst*I: 5'-GACTGCGTACATGCAGNN-3'

Cebadores de *Msel*: 5'-GATGAGTCCTGAGTAANNN-3'

Las Ns en los cebadores indican que esta parte de los cebadores era variable. En la selección por AFLP se utilizaron los 16 cebadores posibles para el cebador de *Pst*I y los 64 cebadores posibles para el cebador de *Msel*. Esto daba un total de 16 x 64 combinaciones de cebadores de *Pst*I y *Msel*, es decir 1024 combinaciones de cebadores. Las 1024 combinaciones de cebadores fueron todas utilizadas en la selección mediante AFLP por marcadores AFLP ligados a *Mi*. Las reacciones de AFLP se realizaron de la siguiente manera:

Las reacciones de AFLP emplearon un cebador de *Pst*I marcado radiactivamente y un cebador de *Msel* no marcado. Los cebadores de *Pst*I fueron marcados en su extremo utilizando ( $\gamma$ -<sup>33</sup>P)ATP y polinucleótido quinasa de T4. Las reacciones de marcaje se realizaron en 50  $\mu$ l de Tris.HCl 25 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, espermidina.3HCl 0,5 mM, utilizando 500 ng del cebador oligonucleotídico, 100  $\mu$ Ci de ( $\gamma$ -<sup>33</sup>P)ATP y 10 unidades de polinucleótido quinasa de T4. Para el análisis mediante AFLP, se preparó una mezcla de reacción de 20  $\mu$ l conteniendo 5 ng del cebador de *Pst*I marcado (0,5  $\mu$ l de la mezcla de reacción de marcaje), 30 ng del cebador de *Msel*, 5  $\mu$ l del ADN molde, 0,4 unidades de polimerasa Taq, Tris.HCl 10 mM pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM, 0,2 mM de los 4 dNTPs. Las reacciones de AFLP fueron realizadas utilizando el siguiente perfil de ciclo: una etapa de desnaturalización del ADN de 30 segundos a 94°C, una etapa de hibridación de 30 segundos (ver más adelante), y una etapa de extensión de un minuto a 72°C. La temperatura de hibridación en el primer ciclo fue de 65°C, posteriormente fue reducida en cada ciclo en 0,7°C durante los siguientes 12 ciclos, y se continuó a 56°C durante los 23 ciclos restantes. Todas las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termociclador PE-9600 (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT, EE.UU.).

#### Análisis en gel de los productos de reacción de AFLP

Después de la amplificación, se mezclaron los productos de reacción con un volumen igual (20  $\mu$ l) de colorante de formamida (formamida 98%, EDTA 10 mM pH 8,0, y azul de bromofenol y xilenocianol como colorantes de rastreo). Las mezclas resultantes se calentaron durante 3 minutos a 90°C, y después se enfriaron rápidamente en hielo. Se cargaron 2  $\mu$ l de cada muestra en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (secuenciación) al 5% (Maxam y Gilbert, Methods in Enzymology, 65, 499-560). La matriz del gel se preparó utilizando acrilamida 5%, metilén bisacrilato 0,25%, urea 7,5 M en Tris 50 mM/ácido bórico 50 mM/EDTA 1 mM. A 100 ml de la solución de gel se añadieron 500  $\mu$ l de APS al 10% y 100  $\mu$ l de TEMED y los geles fueron moldeados utilizando un aparato para geles SequiGen de 38 x 50 cm (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE.UU.). Se utilizaron peines de dientes de tiburón para formar 97 calles en las unidades de gel del SequiGen. Se utilizó Tris 100 mM/ácido bórico 100 mM/EDTA 2 mM como tampón para el proceso. Se realizó la electroforesis a una potencia constante, 110 vatios, durante aproximadamente 2 horas. Después de la electroforesis, los geles se fijaron durante 30 minutos en ácido acético al 10%, se secaron sobre placas de vidrio y se expusieron a pantallas Phosphorimage de Fuji durante 16 horas. Se visualizaron los patrones de huellas utilizando un sistema de análisis Phosphorimage BAS-2000 de Fuji (Fuji Photo Film Company Ltd., Japón).

#### Selección mediante AFLP por marcadores ligados

Se realizó una selección mediante AFLP utilizando todas las 1024 combinaciones posibles de los cebadores de *Pst*I-*Msel* en los dos grupos de líneas casi isogénicas. El objetivo era identificar marcadores AFLP presentes en ambas líneas resistentes y ausentes en ambas líneas susceptibles. Los geles de AFLP contenían las huellas de AFLP de 24 combinaciones de cebadores de las 4 líneas isogénicas, dando un total de 43 geles. Se identificó un total de 30 marcadores AFLP que estaban presentes en ambas líneas resistentes y ausentes en ambas líneas susceptibles. Estos marcadores son referidos como marcadores AFLP ligados a *Mi* candidatos.

A continuación, se realizaron reacciones de AFLP para determinar la presencia de los 30 marcadores candidatos en las 7 líneas de tomate resistentes y en las 11 líneas de tomate susceptibles. De los 30 marcadores candidatos, 20 marcadores parecían estar presentes en las 7 líneas resistentes y ausentes en las 11 líneas susceptibles. Estos 20 marcadores fueron utilizados en estudios adicionales para crear mapas del gen de resistencia *Mi*. Las combinaciones de cebadores requeridas para identificar los 20 marcadores *Pst*I-*Msel* están representadas en la Tabla 1. En la columna con las combinaciones de cebadores, "*Pst*I" se refiere a la secuencia 5'-GACTGCGTACATGCAG-3' y "*Msel*" se refiere a la secuencia 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'. Por ejemplo, el marcador PM14 puede ser identificado utilizando el cebador de *Pst*I que tiene la siguiente secuencia: 5'-GACTGCGTACATGCAGGA-3', y el cebador de *Msel* que tiene la siguiente secuencia: 5'-GATGAGTCCTGAGTAATCT-3'.

TABLA 1

Marcador	Combinación de cebadores con extensiones selectivas (NN/NNN)
PM02	<i>Pst</i> I-AT/ <i>Msel</i> -AAA
PM07	<i>Pst</i> I-AA/ <i>Msel</i> -TAC
PM08	<i>Pst</i> I-CT/ <i>Msel</i> -ACT
PM10	<i>Pst</i> I-CA/ <i>Msel</i> -TCT
PM11	<i>Pst</i> I-TA/ <i>Msel</i> -TGA

PM13	<i>Pst</i> I-GA/ <i>Mse</i> I-ATC
PM14	<i>Pst</i> I-GA/ <i>Mse</i> I-TCT
PM15	<i>Pst</i> I-GT/ <i>Mse</i> I-GAC
PM16	<i>Pst</i> I-GT/ <i>Mse</i> I-TCT
PM17	<i>Pst</i> I-AT/ <i>Mse</i> I-AAG
PM18	<i>Pst</i> I-AT/ <i>Mse</i> I-TAG
PM19	<i>Pst</i> I-GG/ <i>Mse</i> I-ATT
PM20	<i>Pst</i> I-TG/ <i>Mse</i> I-AAT
PM21	<i>Pst</i> I-TG/ <i>Mse</i> I-TTT
PM22	<i>Pst</i> I-TG/ <i>Mse</i> I-GCT
PM23	<i>Pst</i> I-GT/ <i>Mse</i> I-GAA
PM24	<i>Pst</i> I-AA/ <i>Mse</i> I-CTG
PM25	<i>Pst</i> I-AC/ <i>Mse</i> I-GTG
PM27	<i>Pst</i> I-AA/ <i>Mse</i> I-CTA
PM29	<i>Pst</i> I-TA/ <i>Mse</i> I-GGA

### EJEMPLO 3: CONSTRUCCIÓN Y SELECCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE YAC DE TOMATE

#### Material

5 Se utilizó la línea de tomate *Lycopersicon esculentum* E22 (Enza Zaden) homocigota para el locus *Mi* como fuente de ADN para construir una biblioteca de YAC. Se aislaron los protoplastos de las hojas *in vitro* que tenían de dos a tres semanas de edad según está descrito por Van Daelen y col. (Plant Mol. Biol., 12, 341-352).

10 Se recogieron los protoplastos viables (concentración de 50 millones de protoplastos por ml) y se mezclaron con un volumen igual de agarosa (1%, Seaplaque, FMC Bioproducts, Rockland, Maine, EE.UU.) para formar un bloque. Los protoplastos incluidos en los bloques fueron lisados con una mezcla de lisis (EDTA 0,5 M, 1% de sarcosinato de N-laurilo y 1 mg/ml de proteinasa K, pH=8,0). Después de la lisis, los bloques fueron almacenados a 4°C en tampón de almacenamiento (mezcla de lisis fresca) hasta su utilización. Aproximadamente 3 millones de protoplastos por bloque, para obtener aproximadamente 4,5 µg de ADN cromosómico, fueron utilizados para estudios posteriores. El plásmido pYAC4 que contenía un sitio de clonaje único de *Eco*RI fue utilizado como vector de clonaje y la cepa de levadura AB1380 fue utilizada como huésped (Burke y col., Science, 236, 806-812).

#### 15 Construcción de la biblioteca de YAC

El aislamiento de ADN de peso molecular alto, la digestión parcial con *Eco*RI en presencia de metilasa de *Eco*RI, la ligadura de los brazos del vector a ADN genómico, la selección por tamaños a través de electroforesis en gel de campo pulsado y la transformación del huésped levadura, se llevaron a cabo según está descrito por Burke y col. (Science, 236, 806-812) y Larin y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4123-4127).

20 Todas las manipulaciones estándar se realizaron según está descrito en Molecular cloning: a laboratory manual por Sambrook y col. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

25 Se obtuvieron finalmente 3840 clones con un tamaño de inserto promedio de 520 kb, el cual corresponde a 2,2 equivalentes de genoma y los clones individuales fueron almacenados en 40 placas de microvaloración de 96 pocillos que contenían 75 µl de una solución de YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de dextrosa).

#### Selección de la biblioteca de YAC

30 Para reducir el número de muestras manejadas, las células de una placa de microvaloración de 96 pocillos fueron combinadas (una combinación de placa) y utilizadas para el aislamiento de ADN como se describió por Ross y col. (Nucleic Acids Res., 19, 6053). La biblioteca de YAC de tomate de 2,2 equivalentes de genoma constaba de 40 placas de microvaloración de 96 pocillos y como resultado el ADN de las 40 combinaciones de placa fue sometido a selección con los marcadores AFLP, PM10, PM13, PM21 y PM25 utilizando el protocolo de AFLP como se describió en el Ejemplo 2. Se eligieron PM10, PM13, PM21 y PM25 para someter a selección las combinaciones de placa de YAC porque estos marcadores no interfieren con las bandas de fondo de la cepa de levadura AB1380. Se identificaron tres

combinaciones de placa positivas de las 40 sometidas a selección con estos cuatro marcadores AFLP como se muestra en la Tabla 2. Posteriormente, se empleó una selección secundaria con los cuatro marcadores AFLP (PM10, PM13, PM21 y PM25) de los 96 clones de YAC individuales de cada placa para encontrar la dirección correcta de los clones de YAC. Se identificaron tres clones de YAC individuales, designados 1/1084, 1/1172 y 2/1256 (Tabla 2). Posteriormente, los tres clones de YAC individuales fueron analizados con los marcadores AFLP restantes. Todos los marcadores identificados, PM02 a PM29, estaban presentes en uno o más de estos tres clones de YAC (Tabla 3). El tamaño del clon de YAC fue determinado mediante análisis electroforético en gel de campo pulsado (PFGE) utilizando un campo eléctrico homogéneo fijado al contorno (CHEF; Chu y col., Science, 235, 1582-1585) y pareció ser de 470 kb (1/1084), 570 kb (1/1172) y 500 kb (2/1256), respectivamente.

TABLA 2

Combinación de placa nº	PM10	PM13	PM21	PM25	YAC detectado (tamaño en kb)
2	-	-	+	-	YAC 1/1172 (570 kb)
16	+	+	-	+	YAC 2/1256 (500 kb)
4	-	+	-	-	YAC 1/1084 (470 kb)

TABLA 3

Marcador	1/1172	2/1256	1/1084
PM02	-	-	+
PM07	-	+	-
PM08	-	+	+
PM10	-	+	-
PM11	-	+	-
PM13	-	+	+
PM14	+	+	-
PM15	-	+	-
PM16	+	-	-
PM17	-	+	-
PM18	-	+	+
PM19	-	+	-
PM20	-	+	-
PM21	+	-	-
PM22	-	+	+
PM23	-	+	-
PM24	-	+	-
PM25	-	+	-
PM27	-	+	-
PM29	-	+	-

#### EJEMPLO 4: CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA FÍSICO DE GRAN ALCANCE DEL CONTIG DE YAC CON *Mi* Y UBICACIÓN DE LOS MARCADORES AFLP

Los tres clones de YAC 1/1172, 2/1256 y 1/1084 fueron sometidos a digestión parcial con una concentración creciente de los enzimas de restricción *Sfi*I y *Bss*HI. Las muestras fueron fraccionadas por PFGE,

transferidas a una membrana Gene Screen Plus (DuPont NEN, Boston MA, EE.UU.) y analizadas por hibridación utilizando sondas de secuencias adyacentes a los extremos de acuerdo con el protocolo para el mapeo indirecto mediante marcas en los extremos según está descrito por Burke y col. (Science, 236, 806-812). Pudo construirse un mapa físico de YAC 1/1172, 2/1256 y 1/1084 para los enzimas *Sfi*I y *Bss*HIII según se muestra en la Figura 1. El solapamiento entre los varios clones de YAC fue determinado mediante análisis de transferencia Southern utilizando los fragmentos de restricción obtenidos como sonda sobre el digesto de los tres clones de YAC. Un contig de YAC con un tamaño de 1,4 Mb pudo ser construido. Con el fin de aislar los fragmentos de YAC, los digestos fueron procesados en PFGE. La digestión de YAC 1/1172 con *Sfi*I dio como resultado dos fragmentos (200 kb y 370 kb). La digestión de YAC 2/1256 con *Bss*HIII dio como resultado cuatro fragmentos (40 kb, 90 kb, 110 kb y 260 kb), mientras que la digestión de YAC 1/1084 con *Bss*HIII dio dos fragmentos con un tamaño de 70 y 400 kb. Como resultado, el contig de YAC de 1,4 Mb pudo ser separado en 8 regiones correspondientes a los 8 fragmentos de restricción obtenidos a partir de los tres clones de YAC, cubriendo la región de *Mi* completa y secuencias adyacentes.

Para colocar los diferentes marcadores AFLP dentro de estas 8 regiones sobre el mapa físico, los marcadores AFLP fueron utilizados como sondas de hibridación en los digestos parciales y completos de *Sfi*I y *Bss*HIII de los clones de YAC 1/1172, 2/1256 y 1/1084. Por lo tanto, cada fragmento marcador AFLP fue cortado del gel secado y eluido mediante difusión en un tampón conteniendo acetato de amonio 0,5 M, acetato de magnesio 10 mM, EDTA 1 mM (pH=8,0), SDS 0,1%, reamplificado con los cebadores de AFLP no marcados correspondientes y marcado posteriormente con <sup>32</sup>P de acuerdo con el método de cebadores aleatorios de Feinberg y Vogelstein (Anal. Biochem., 132, 6-10). Cada marcador AFLP pudo ser asignado a una o más de las ocho regiones según está esquematizado en la Tabla 4 y la Figura 1.

TABLA 4

Fragmento de YAC	Marcadores AFLP ligados a <i>Mi</i> detectados mediante hibridación
Fragmento de <i>Sfi</i> I 1/1172 de 200 kb	-
Fragmento de <i>Sfi</i> I 1/1172 de 370 kb	PM14, PM16, PM21
Fragmento de <i>Bss</i> HIII 2/1256 de 260 kb	PM10, PM11, PM17, PM19, PM23, PM24, PM29
Fragmento de <i>Bss</i> HIII 2/1256 de 90 kb	PM07, PM27
Fragmento de <i>Bss</i> HIII 2/1256 de 110 kb	PM08, PM13, PM14, PM15, PM20, PM22, PM25
Fragmento de <i>Bss</i> HIII 2/1256 de 40 kb	PM18
Fragmento de <i>Bss</i> HIII 1/1084 de 70 kb	PM08, PM13, PM22
Fragmento de <i>Bss</i> HIII 1/1084 de 400 kb	PM02, PM18

#### EJEMPLO 5: CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA COSMÍDICA DE LOS CLONES DE YAC 1/1172 Y 2/1256

##### Material

El vector cosmídico binario pJJ04541 es un derivado de pJJ1881 (Jones y col., Transgenic Research, 1, 285-297) y está basado en el plásmido pRK290 que contiene el gen de resistencia a tetraciclina para la selección en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*. En el único sitio de *Eco*RI de pRK290, ADN-T que lleva secuencias (LB; repetición del límite izquierdo, RB significa la repetición del límite derecho) que flanquean:

- el sitio de cos del bacteriófago lambda,
- el gen de la fosfotransferasa de neomicina (Beck y col., Gene, 19, 327-336) cuya expresión está dirigida por la secuencia del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell y col., Mol. Gen Genet., 223, 369-378), y
- la secuencia del poliadaptador de pBluescript (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.). El tamaño de pJJ04541 asciende a 29 kb y se muestra esquemáticamente en la Figura 2. La capacidad de clonaje de este vector cosmídico binario, utilizando extractos de empaquetamiento del fago lambda, está dentro del rango de 9 a 24 kb.

##### Construcción de la biblioteca

El ADN total de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AB1380 que contenía YAC 1/1172 y el ADN total de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AB1380 que contenía YAC 2/1256 fue aislado utilizando zimoliasa para producir protoplastos de acuerdo con Green y Olsen (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1213-1217).

Se analizó una alícuota de ambos ADNs en PFGE. Ambos aislados de ADN parecían tener un tamaño de  $\geq 100$  kb.

Aproximadamente 15 µg de cada ADN fueron digeridos parcialmente con *Sau3A* generando moléculas con un tamaño promedio de 15-25 kb. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a través de un gradiente de sacarosa del 10-35% durante 22 horas, 22.000 rpm a 20°C en un rotor Beckman SW41. Se recogieron fracciones de 0,5 ml utilizando una aguja perforada a través del fondo del tubo de centrifuga. Una alícuota de estas fracciones fue analizada en un gel de agarosa al 0,7%. Las fracciones que contenían moléculas de ADN con un tamaño de ≈20 kb fueron combinadas y concentradas mediante precipitación con etanol.

Posteriormente, los extremos cohesivos fueron parcialmente rellenos con dATP y dGTP utilizando la estrategia de relleno parcial de extensiones 5' de ADN producidas por endonucleasas de restricción de tipo II según está descrito por Korch (Nucleic Acids Res., 15, 3199-3220) y Loftus y col. (Biotechniques, 12, 172-176).

El vector cosmídico binario pJJ04541 fue digerido completamente con *XhoI* y el fragmento lineal fue parcialmente relleno con dTTP y dCTP según está descrito por Korch (Nucleic Acids Res., 15, 3199-3220).

Los fragmentos de 20 kb fueron ligados al vector cosmídico y transducidos a la cepa de *E. coli* XL1-Blue MR (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) utilizando extractos de empaquetamiento del fago lambda Gigapack II XL (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) según está recomendado por los fabricantes. La selección se realizó sobre placas de agar LB (1% de bacto triptona, 0,5% de extracto de bacto levadura y 1% de NaCl, pH 7,5) conteniendo 10 mg/l de tetraciclina. Dos bancos de aproximadamente 250.000 clones de cósmidos por banco fueron producidos a partir de 2-3 µg de ADN de levadura fraccionado por tamaños de los clones de YAC 1/1172 y 2/1256, respectivamente.

Posteriormente, estos transformantes fueron almacenados en los pocillos de placas de microvaloración (96 pocillos, 100 µl del medio LB conteniendo 10 mg/l de tetraciclina). Réplicas de la cuadrícula de 96 pocillos de los clones cosmídicos en las placas de microvaloración fueron estampadas sobre filtros de membrana Gene Screen Plus (NEN DuPont) y se dejaron crecer hasta formar colonias sobre el medio. La hibridación de colonias, según está descrito por Sambrook y col. (en: Molecular cloning: a laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) utilizando los clones de YAC 1/1172 y 2/1256 marcados con <sup>32</sup>P reveló cósmidos positivos. De 10.000 colonias aproximadamente de YAC 1/1172 se identificaron 200 clones de cósmidos positivos aproximadamente. De 20.000 colonias aproximadamente de YAC 2/1256 se identificaron 300 clones de cósmidos positivos.

## **EJEMPLO 6: CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA PRECISO DEL SEGMENTO DEL GEN DE RESISTENCIA *Mi* Y UBICACIÓN DE LOS MARCADORES AFLP**

### **División de los cósmidos en regiones definidas**

Con el fin de dividir los cósmidos en siete regiones definidas, los 200 clones de cósmidos positivos de YAC 1/1172 y los 300 clones de cósmidos positivos de YAC 2/1256 fueron hibridados con 7 de los 8 fragmentos de restricción (fragmentos de YAC) como se esquematizó en el Ejemplo 4 (ver la Tabla 4 y la Figura 1). Los cósmidos positivos para cada uno de los 7 fragmentos de YAC fueron identificados. Además, se pudieron identificar cósmidos que reaccionaban positivamente con los fragmentos de restricción solapantes de los dos clones de YAC diferentes.

### **Construcción de un contig cosmídico del segmento del gen de resistencia *Mi***

Con el fin de construir un contig cosmídico de todos los cósmidos positivos identificados en las varias regiones definidas, se utilizó la amplificación de fragmentos de restricción. Aproximadamente 500 ng de cada cósmido fueron utilizados para la preparación del molde y los cebadores de la amplificación de los fragmentos de restricción fueron un cebador de *EcoRI* 5'-GACTGCGTACCAATTC-3' que no tenía ningún nucleótido selectivo y un cebador de *MseI* 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3' que no tenía ningún nucleótido selectivo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2. El cebador de *EcoRI* fue marcado en el extremo 5' y los 500 cósmidos fueron todos amplificados utilizando el grupo de cebadores de *EcoRI/MseI*. Las huellas de ADN contenían de 8 a 20 fragmentos amplificados aproximadamente. Grupos de cósmidos conteniendo fragmentos amplificados de tamaño idéntico fueron seleccionados de cada región y se volvieron a procesar en geles de poliacrilamida como se describió en el Ejemplo 2 hasta que se pudo construir una serie contigua de todos los fragmentos amplificados de todas las regiones definidas. Además, el contig cosmídico de una región fue alineado con las regiones adyacentes con el fin de construir un contig cosmídico del locus *Mi*. De esta manera, se construyó un contig cosmídico de 96 cósmidos, que abarcaba el locus *Mi*, de aproximadamente 800 kb.

### **Ubicación detallada de los marcadores AFLP ligados a *Mi* en el contig cosmídico**

Con el fin de ubicar los 20 marcadores AFLP ligados a *Mi* en el contig cosmídico, los 96 cósmidos fueron digeridos con *PstI* seguido por análisis de transferencia Southern de acuerdo con Southern, J. Mol. Biol., 98, 503-515.

Los marcadores AFLP fueron utilizados como sondas de hibridación según se describió en el Ejemplo 4 en la transferencia Southern de los 96 digestos de *PstI* de los cósmidos. La posición exacta de los marcadores AFLP ligados a *Mi*, excepto el marcador PM02, está esquematizada en la Figura 3A.

**EJEMPLO 7: ANÁLISIS GENÉTICO DE LOS MUTANTES DE *Mi***

Una familia de líneas de tomate mutantes se hizo disponible a través de Enza Zaden. Estas líneas fueron derivadas de un F<sub>1</sub> híbrido heterocigoto para el gen de resistencia *Mi* y heterocigoto para el gen *Aps-1* (que codifica fosfatasa ácida-1), que está ligado muy estrechamente a *Mi* (Stevens y Rick, 1986, en: *The Tomato Crop.*, Atherton & Rudich edit., Chapman y Hall, p. 35-109). Se pudieron determinar diferentes alelos del gen *Aps-1* mediante análisis de isozimas (Vallejos, 1983, en: *Isozymes in plant genetics and breeding*, Tanksley y Orton edit., parte A, Elsevier, Amsterdam, 469-515). El alelo *Aps-1*<sup>1</sup> procede de *L. peruvianum* y ha sido introgresado en varios genotipos de tomate resistentes a nematodos a través de co-segregación con el gen de resistencia *Mi*. Un esquema de estas líneas mutantes está representado a continuación:

10 Híbrido F<sub>1</sub> (*Aps-1* heterocigoto, fenotipo resistente a *Mi*)

↓ autofecundado

Líneas F<sub>2</sub> (segregación de *Aps-1* 1:2:1, segregación de resistencia a *Mi* 3:1)

↓ autofecundación de plantas F<sub>2</sub> heterocigotas (*Aps-1*)

Líneas F<sub>3</sub> (segregación de *Aps-1* 1:2:1, segregación de resistencia a *Mi* 3:1)

15 ↓ autofecundación de plantas F<sub>3</sub> heterocigotas (*Aps-1*)

Líneas F<sub>4</sub> (segregación de *Aps-1* 1:2:1, segregación de resistencia a *Mi* 3:1)

↓ autofecundación de plantas F<sub>4</sub> heterocigotas (*Aps-1*)

Líneas F<sub>5</sub> (segregación de *Aps-1* 1:2:1, susceptibles a *Mi*)

↓ autofecundación de plantas F<sub>5</sub> heterocigotas (*Aps-1*)

20 Líneas F<sub>6</sub> (segregación de *Aps-1* 1:2:1, susceptibles a *Mi*)

↓ autofecundación de plantas F<sub>6</sub> homocigotas (*Aps-1*<sup>1</sup>)

Líneas F<sub>7</sub> (todas *Aps-1*<sup>1</sup>, susceptibles a *Mi*)

↓ autofecundación de plantas F<sub>7</sub> homocigotas (*Aps-1*<sup>1</sup>)

Líneas F<sub>8</sub> (todas *Aps-1*<sup>1</sup>, susceptibles a *Mi*)

25 En las líneas F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> y F<sub>4</sub> de esta familia la presencia del alelo *Aps-1*<sup>1</sup> se correlaciona con el fenotipo resistente a *Mi*, mientras que la ausencia del alelo *Aps-1*<sup>1</sup> se correlaciona con el fenotipo susceptible a *Mi*. En la F<sub>5</sub> y las progenies posteriores, esta correlación se pierde: todas las plantas son susceptibles a nematodos independientemente de los alelos *Aps-1*<sup>1</sup>.

30 Veinte individuos de cada generación F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub>, F<sub>7</sub> y F<sub>8</sub> fueron analizados para determinar su resistencia a nematodos, para determinar la presencia del alelo *Aps-1* y la presencia de los marcadores AFLP ligados a *Mi*. El análisis de nematodos de las plántulas se realizó en tierra contaminada con agallas de raíces de *M. incognita*. Los resultados de resistencia a nematodos fueron como se indicó en el esquema anterior: segregación 3:1 en plantas F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> y F<sub>4</sub> y susceptibilidad en F<sub>5</sub> y en las poblaciones de la progenie. La mayoría de los marcadores AFLP ligados a *Mi* indicaban un genotipo *Mi* idéntico igual que el marcador de isozimas de *Aps-1*. Sin embargo, 3 de los marcadores AFLP, PM14, PM16 y PM25 parecían segregarse con el fenotipo *Mi*: en la mayoría de las plantas F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub>, F<sub>7</sub> y F<sub>8</sub>, la susceptibilidad a *Mi* estaba indicada por la ausencia de estos marcadores. Los marcadores AFLP PM14, PM16 y PM25 mostraron una correlación entre el genotipo *Mi* de AFLP y el fenotipo *Mi* en los mutantes. Los marcadores PM14 y PM25 están adyacentes en el mapa físico como se muestra en la Figura 3B, y, por lo tanto, se postuló que la región que rodea a estos marcadores AFLP era una buena candidata para contener el gen de resistencia *Mi*.

**EJEMPLO 8: MAPA FÍSICO DE LOS CLONES COSMÍDICOS SOLAPANTES QUE CONTIENEN EL GEN DE RESISTENCIA *Mi***

La identificación de los cósmidos que hibridaban con los marcadores AFLP ligados a *Mi* PM14 y PM25 se realizó en el Ejemplo 6. PM14 identifica a los cósmidos Mi-11, Mi-18 y Mi-01, mientras que PM25 identifica a los cósmidos Mi-18 y Mi-01.

45 Posteriormente, una pequeña serie de cósmidos alrededor de los cósmidos Mi-11, Mi-18 y Mi-01 fue seleccionada del contig cosmídico descrito en el Ejemplo 6. Se seleccionó un contig de 6 cósmidos que contenía los 3 cósmidos identificados y los cósmidos adyacentes. Estos 6 cósmidos son Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18, Mi-01 y Mi-14. Con el fin de realizar un mapa físico preciso de estos 6 cósmidos, las muestras de ADN del contig cosmídico fueron digeridas con *Pst*I seguido por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. El solapamiento físico entre los diferentes

cósmidos pudo ser determinado. Mediante la combinación de estos datos con los datos obtenidos con respecto a la ubicación detallada de los marcadores AFLP ligados a *Mi* en el contig cosmídico (ver el Ejemplo 6), pudo construirse un mapa físico preciso con la ubicación de PM14 y PM25 según se muestra en la Figura 4. Se calculó que el contig cosmídico alrededor de los marcadores AFLP PM14 y PM25 tenía 50 kb aproximadamente.

## 5 EJEMPLO 9: TRANSFORMACIÓN

### Transferencia de los cósmidos a *Agrobacterium tumefaciens*

Los clones cosmídicos Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18, Mi-01, Mi-14 y el cósmido control pJJ04541 fueron introducidos en *Agrobacterium tumefaciens* mediante transferencia por conjugación en un apareamiento triparental con la cepa cooperadora HB101 (pRK2013) esencialmente de acuerdo con Deblaere y col. (Methods in Enzymology, 153, 277-292). Se cultivó *E. coli* en el medio LB (1% de bacto-triptona, 0,5% de extracto de bacto-levadura y 1% de NaCl, pH 7,5) suplementando con 5 mg/l de tetraciclina a 37°C. La cepa cooperadora HB101 (pRK2013) fue cultivada bajo condiciones idénticas en el medio LB suplementado con 100 mg/l de sulfato de kanamicina.

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (Lazo y col., Bio/Technology, 9, 963-971, 1991) fue cultivada en medio LB suplementado con 100 mg/l de carbenicilina a 28°C.

Los cultivos de una noche fueron diluidos 1:100 en medio LB sin ningún antibiótico y después de 6 horas de crecimiento, se mezclaron 0,1 ml del cultivo de *Agrobacterium*, del cultivo de la cepa cooperadora y del cultivo de una cepa de cósmido y se sembraron en placas de agar LB sin antibióticos. Después de incubación durante una noche a 28°C, la mezcla fue sembrada en placas de agar con medio LB conteniendo 100 mg/l de carbenicilina y 10 mg/l de tetraciclina para seleccionar los transconjugantes. Las placas fueron incubadas durante 3-4 días a 28°C. Se realizaron dos pases seriados a través de placas de agar selectivas para seleccionar colonias de *Agrobacterium* transconjugantes individuales.

### Caracterización de los transconjugantes de *A. tumefaciens*

Se desarrollaron cultivos a pequeña escala a partir de las colonias seleccionadas y se cultivaron en medio LB conteniendo 10 mg/l de tetraciclina. El ADN plasmídico fue aislado mediante lisis alcalina utilizando el método descrito por Ish-Horowitz y col. (Nucleic Acids Res., 9, 2989-2997, 1981) y digerido con *Bgl*II utilizando técnicas estándar. Además, se realizó la amplificación de fragmentos de restricción en minipreparaciones de ADN de *A. tumefaciens* utilizando la combinación de enzimas *Eco*RI/*Mse*I y cebadores que no tenían ningún nucleótido selectivo según se describió en el Ejemplo 6. Posteriormente, se comparó el patrón del enzima de restricción *Bgl*II así como la huella de ADN del transconjugante de *A. tumefaciens* con el de las minipreparaciones de ADN de la cepa de *E. coli* que contenía el cósmido. Solamente aquellos transconjugantes de *A. tumefaciens* que albergaban un cósmido con el mismo patrón de ADN que el cultivo de *E. coli* correspondiente fueron utilizados para transformar una línea de tomate susceptible.

### Transformación de una línea de tomate susceptible

Semillas de la línea de tomate susceptible 52201 (Rijk Zwaan, De Lier, Países Bajos) fueron esterilizadas superficialmente en hipoclorito de sodio al 2% durante 10 minutos, lavadas tres veces en agua destilada estéril y colocadas sobre un medio de germinación (que consistía en un medio MS de potencia media de acuerdo con Murashige y Skoog, Physiol. Plant., 15, 473-497, con un 1% (p/v) de sacarosa y un 0,8% de agar) en jarras de vidrio o en recipientes de cultivo de polipropileno. Se dejaron germinar durante 8 días. Las condiciones de cultivo fueron 25°C, una densidad de flujo de fotones de  $30 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , y un fotoperiodo de 16/24 horas.

La transformación del tomate se realizó de acuerdo con Koornneef y col. (1986), en: Tomato Biotechnology, 169-178, Alan R. Liss, Inc., y se describe brevemente a continuación. Se precultivaron explantes de cotiledones de 8 días de edad durante 24 horas en placas Petri contiendo una capa alimentadora de células en suspensión de *Petunia hybrida* sembradas en medio MS20 (medio de cultivo de acuerdo con Murashige y Skoog (1962), Physiol. Plant., 15, 473-497, con un 2% (p/v) de sacarosa y un 0,8% de agar) suplementado con ácido  $\alpha$ -naftalenacético 10,7  $\mu\text{M}$  y 6-bencilaminopurina 4,4  $\mu\text{M}$ . Los explantes fueron luego infectados con el cultivo de una noche diluido de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo los clones cosmídicos Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18, Mi-01 y Mi-14 o el vector cosmídico pJJ04541 durante 5-10 minutos, secados sobre un papel de filtro estéril y cocultivados durante 48 horas en las placas con capa alimentadora originales. Las condiciones de cultivo fueron como las descritas anteriormente. Los cultivos de una noche de *Agrobacterium tumefaciens* fueron diluidos en medio MS20 líquido (medio de acuerdo con Murashige y Skoog (1962) con un 2% (p/v) de sacarosa, pH 5,7) hasta una D.O.<sub>600</sub> de 0,8.

Después del cocultivo, los explantes de cotiledones fueron transferidos a placas Petri con medio selectivo que consistía en MS20 suplementado con zeatina 4,56  $\mu\text{M}$ , vancomicina 67,3  $\mu\text{M}$ , cefotaxima 418,9  $\mu\text{M}$  y sulfato de kanamicina 171,6  $\mu\text{M}$ , y cultivados bajo las condiciones de cultivo descritas anteriormente. Los explantes fueron subcultivados cada tres semanas en medio fresco. Los brotes emergentes fueron disecados de los callos subyacentes y transferidos a jarras de vidrio con medio selectivo sin zeatina para que se formaran raíces. La formación de raíces en un medio conteniendo sulfato de kanamicina se consideró como una indicación de la naturaleza transgénica del brote en cuestión. Los regenerantes transgénicos auténticos fueron propagados *in vitro* subcultivando el meristemo apical y las yemas auxiliares en jarras de vidrio con medio selectivo fresco sin zeatina.

**EJEMPLO 10: ANÁLISIS DE COMPLEMENTACIÓN****Identificación de cósmidos con el gen de resistencia *Mi* mediante selección por resistencia en raíces de plantas transformadas**

Raíces de plantas  $R_0$  transformadas cultivadas *in vitro* han sido sometidas al ensayo de enfermedad según se describió en el Ejemplo 1. De cada transformante se han analizado dos explantes de raíz. En total, se han analizado 72 plantas  $R_0$  de 7 transformaciones cosmidicas diferentes; 6 cósmidos que llevaban un inserto de ADN de tomate y 1 cósmido, pJJ04541, sin inserto de ADN de tomate. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Sesenta y tres plantas  $R_0$  transgénicas parecían susceptibles, ya que se habían formado agallas en al menos uno de los dos cultivos de raíces. Nueve plantas  $R_0$  se clasificaron como resistentes, ya que no pudo encontrarse ninguna agalla en los cultivos de raíces. Siete plantas resistentes habían sido derivadas de la transformación con el cósmido Mi-11, mientras que dos plantas resistentes habían sido derivadas con el cósmido Mi-18, que solapa una gran parte con el cósmido Mi-11. Los cósmidos Mi-11 y Mi-18 fueron utilizados para un análisis molecular posterior.

TABLA 1

Cósmido	Plantas $R_0$	
	Resistentes	Susceptibles
Mi-32	0	8
Mi-30	0	11
Mi-11	7	4
Mi-18	2	8
Mi-01	0	10
Mi-14	0	15
pJJ04541	0	7

**Análisis molecular de las plantas transformadas con un fenotipo resistente**

Para demostrar que el fenotipo resistente de las plantas  $R_0$  transgénicas, las cuales habían sido transformadas con los cósmidos solapantes Mi-11 y Mi-18, estaba determinado por el inserto genómico presente en los diferentes cósmidos, se realizó un análisis AFLP con el marcador AFLP PM14. La amplificación selectiva de fragmentos de restricción se realizó con la combinación de cebadores que identificaban al marcador PM14 para las plantas  $R_0$  transformadas con los cósmidos Mi-11 y Mi-18. Las huellas de ADN obtenidas mostraron la presencia del marcador PM14 en las plantas resistentes, indicando que el inserto genómico presente en los cósmidos Mi-11 y Mi-18 también está presente en las plantas  $R_0$  y que los dos cósmidos solapantes identificados Mi-11 y Mi-18 contienen el gen de resistencia *Mi*.

Los insertos de los cósmidos Mi-11 y Mi-18 y los insertos de los cósmidos adyacentes Mi-32 y Mi-30 por un lado, y de los cósmidos Mi-01 y Mi-14 por el otro lado, fueron caracterizados posteriormente. Se calculó que la región de ADN que contenía el gen de resistencia *Mi*, sobre la base del solapamiento entre los cósmidos Mi-11 y Mi-18, tenía 16-18 kb aproximadamente. Sobre la base de la susceptibilidad de las plantas  $R_0$  que tenían el inserto presente en el cósmido Mi-30, esta región pudo ser reducida hasta 12 kb aproximadamente. Se secuenció un segmento de ADN que contenía el gen de resistencia *Mi*, correspondiente a la región flanqueada por los extremos derechos de los cósmidos Mi-30 y Mi-11 (ver la Figura 4).

**EJEMPLO 11: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS Y SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA DEL GEN DE RESISTENCIA *Mi* DEL TOMATE****Subclonaje del segmento de ADN solapante**

Para determinar la secuencia del segmento de ADN solapante en los cósmidos Mi-11 y Mi-18 que contenía el gen de resistencia *Mi*, se generó un grupo de subclones aleatorios con un tamaño de inserto de aproximadamente 2 kb. Se cortaron 7,5  $\mu$ g de ADN purificado en CsCl de los cósmidos Mi-11 y Mi-18 durante 10 segundos a 4°C con una potencia de la sonda del 15% (en 40  $\mu$ l de Tris-acetato 10 mM, Mg-acetato 10 mM y K-acetato 50 mM) utilizando un sonicador Misonix (Misonix Inc., Farmingdale, NY, EE.UU.) (tipo XL-2020) con el soporte de la cubeta lleno de agua (tipo 431A). Posteriormente, el ADN fue calentado durante 10 minutos a 60°C y enfriado a temperatura ambiente. Los extremos de los fragmentos de ADN fueron reparados agregando 10  $\mu$ l de una mezcla de reparación (Tris-acetato 10 mM, Mg-acetato 10 mM, K-acetato 50 mM, 10 U de ADN polimerasa Klenow, 10 U de ADN polimerasa  $T_4$  y 2 mM de los 4 dNTP's) seguido por incubación durante 30 minutos a 20°C. El ADN cortado fue separado mediante electroforesis en un gel de agarosa GTG Seakem al 1% (FMC Bio Products, Rockland, ME, EE.UU.). La fracción con un tamaño de 1,8-2,2 kb fue cortada del gel y posteriormente el corte de gel fue digerido con  $\beta$ -agarasa I de

acuerdo con el protocolo del fabricante (New England Biolabs Inc., Beverly, MA; EE.UU.) y el ADN fue precipitado.

Un vector pUC19 modificado (denominado pStuc) fue utilizado para clonar la fracción de 1,8-2,2 kb. En este vector, el fragmento *Bam*HI/*Sa*I de pUC19 fue reemplazado por un fragmento de ADN conteniendo sitios de restricción de *Stu*I, *Spe*I y *Sa*I utilizando dos cebadores oligonucleotídicos y técnicas de clonaje estándar según está descrito por Sambrook y col. (en: Molecular cloning: a laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). La fracción de 1,8-2,2 kb fue ligada a 16°C en el vector pStuc digerido con *Stu*I y desfosforilado. La mezcla de ligadura fue utilizada posteriormente para transformar células ultracompetentes Epicurean Coli XL2-Blue MRF<sup>+</sup> (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). Se cultivaron colonias individuales y se almacenaron en placas de microvaloración de 384 pocillos (100 µl del medio LB conteniendo 100 mg/l de carbenicilina).

Para aislar los clones que representaban la región de ADN solapante de los cósmidos Mi-11 y Mi-18 que contenía el gen de resistencia *Mi*, se utilizaron los fragmentos de *Pst*I de 8,6 y 4,5 kb del clon cosmidico Mi-18 (ver la Figura 4), así como el marcador AFLP PM14, como sondas de hibridación en hibridaciones de colonias. Por lo tanto, réplicas de la cuadrícula de 384 pocillos de los clones en placas de microvaloración fueron estampadas sobre filtros de membrana Gene Screen Plus (DuPont NEN, Boston, MA, EE.UU.) y se dejaron crecer en colonias sobre el medio. Se utilizaron 84 clones positivos para aislar el ADN plasmídico empleando el método de lisis alcalina según está descrito por Ish-Horowicz y col., 1981, Nucl. Acids Res., 9, 2989-2997.

#### Análisis de la secuencia

Se utilizó el kit "ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" para llevar a cabo las reacciones de secuenciación en un sistema Gene-Amp PCR Modelo 9600 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, EE.UU.). Se utilizaron cebadores directos e inversos de M13 estándar. Los productos de reacción fueron analizados en geles de 48 cm de un ABI PRISM 377. La secuencia de ADN de 84 clones seleccionados fue determinada utilizando los cebadores de secuenciación directos e inversos estándar. El ensamblaje y el análisis de la secuencia se realizó con la versión de 1994 del programa de análisis de secuencias STADEN (Dear y Staden, 1991, Nucl. Acids Res., 19, 3907-3911). Pudo formarse una secuencia de ADN contigua de aproximadamente 9,9 kb de nucleótidos y está mostrada en la Figura 5. Pudo deducirse un marco de lectura abierto grande de 3621 nucleótidos (ORF2) que codificaba un polipéptido truncado de 1206 aminoácidos (Figura 7B).

#### EJEMPLO 12: INFECCIÓN POR NEMATODOS DE LOS NUDOS DE LA RAÍZ: INOCULACIÓN DEL SUELO

Suelo infectado con el nematodo del nudo de la raíz *Meloidogyne incognita* fue preparado como sigue: se cortaron en trozos sistemas de raíces de plantas de tomate altamente infectadas con un gran número de agallas (o nudos de la raíz), y se mezclaron con tierra fresca.

Se sembraron semillas o se transfirieron pequeñas plántulas con raíz al suelo infectado. Las plantas se desarrollaron en un invernadero a una temperatura de 25°C. Después de 4 a 8 semanas, las plantas fueron arrancadas cuidadosamente del suelo y las raíces fueron lavadas con agua con el fin de eliminar la tierra adherida. Se determinó el nivel de infección contando el número de agallas formadas.

Las plantas fueron consideradas resistentes cuando eran visibles tres agallas o menos en las raíces. Las plantas fueron consideradas susceptibles cuando se formaron más de tres agallas en el sistema radicular.

#### EJEMPLO 13: ANÁLISIS DE COMPLEMENTACIÓN

Identificación de cósmidos con el gen de resistencia *Mi* mediante selección por resistencia de las progenies autofecundadas de las plantas transformadas.

Los regenerantes primarios (generación R<sub>0</sub>) de los experimentos de transformación fueron cultivados en el invernadero para que produjeran semillas. Para cada cósmido, se cultivaron de diez a quince regenerantes y se recogieron las semillas R<sub>1</sub>. Las líneas R<sub>1</sub> de al menos 7 plantas R<sub>0</sub> de cada cósmido fueron analizadas para determinar su resistencia frente a *Meloidogyne incognita* con el fin de identificar cósmidos con el de resistencia. De 20 a 30 plantones o plántulas de cada línea R<sub>1</sub> fueron inoculados y evaluados según se describió en el Ejemplo 12.

En total se analizaron 63 líneas R<sub>1</sub> de 7 diferentes transformaciones cosmidicas; 6 cósmidos que llevaban el inserto de ADN del tomate y un cósmido, pJJ04541, sin el inserto de ADN de tomate. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Cincuenta y cuatro plantas R<sub>0</sub> transgénicas parecían ser susceptibles, ya que se formaron agallas en los sistemas de raíces de todas las plantas R<sub>1</sub> analizadas. Nueve plantas R<sub>0</sub> se consideraron resistentes, ya que por lo menos la mitad de las plantas de cada línea R<sub>1</sub> tuvieron tres agallas o menos. Una línea R<sub>1</sub> fue completamente resistente, seis líneas R<sub>1</sub> se segregaron en una proporción de aproximadamente 3:1 (plántulas resistentes respecto a susceptibles), y las progenies de dos plantas R<sub>0</sub> se segregaron 1:1. Las nueve plantas R<sub>0</sub> resistentes derivaban todas de transformaciones con el cósmido Mi-11.

La evidencia genética adicional de la presencia del gen de resistencia *Mi* en el cósmido Mi-11 se obtuvo en la siguiente generación. Las plantas R<sub>1</sub> resistentes fueron autofecundadas. Catorce de las líneas R<sub>2</sub> resultantes, que se originaron de cuatro plantas R<sub>0</sub> diferentes, fueron analizadas para determinar su resistencia frente a *M. incognita*. De veinte a treinta plantones de cada línea R<sub>2</sub> fueron inoculados y evaluados según se describió en el Ejemplo 12. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Cinco líneas R<sub>2</sub> fueron completamente resistentes, indicando que las

plantas R<sub>1</sub> parentales eran homocigotas para el gen de resistencia *Mi*. Ocho líneas R<sub>2</sub> se segregaron en una proporción de 3:1, indicando que sus plantas R<sub>1</sub> parentales eran heterocigotas para el gen de resistencia *Mi*. Una línea R<sub>2</sub> se segregó en una proporción de aproximadamente 1:1, y ninguna de las líneas analizadas parecía ser completamente susceptible. Estos resultados demuestran que las plantas R<sub>1</sub> seleccionadas, las cuales derivan de varias plantas transformadas con el cósmido Mi-11, contienen el gen de resistencia *Mi* funcional.

TABLA 2

Cósmido	Número de líneas R <sub>1</sub> de plantas R <sub>0</sub> independientes analizadas				
	Total	Proporción de segregación R:S (resistentes respecto a susceptibles)			
		1:0	3:1	1:1	0:1
Mi-32	7	0	0	0	7
Mi-30	9	0	0	0	9
Mi-11	9	1	6	2	0
Mi-18	8	0	0	0	8
Mi-01	10	0	0	0	10
Mi-14	9	0	0	0	9
pKK04541	11	0	0	0	11

TABLA 3

Cósmido	Número de líneas R <sub>2</sub> de plantas R <sub>1</sub> independientes analizadas				
	Total	Proporción de segregación R:S (resistentes respecto a susceptibles)			
		1:0	3:1	1:1	0:1
Mi-1	14	5	8	1	0

#### 10 EJEMPLO 14: ENSAYO DE INFECCIÓN CON EL ÁFIDO DE LA PATATA

Se inocularon plantas pequeñas de tomate (4 semanas de edad) con el áfido de la patata (*Macrosiphum euphorbiae*) colocando de cinco a ocho áfidos hembra sobre las hojas. Las plantas fueron cultivadas en el invernadero a una temperatura de 18° a 20°C. Después de una a dos semanas, se determinó el nivel de resistencia contando el número de áfidos recién nacidos.

15 Las plantas fueron consideradas resistentes cuando no estaban presentes áfidos vivos en el tallo o en las hojas. Las plantas eran susceptibles cuando estaban presentes áfidos recién nacidos.

#### EJEMPLO 15: ANÁLISIS DE COMPLEMENTACIÓN

Identificación de cósmidos con el gen de resistencia *Meu-1* mediante selección por resistencia de las progenies autofecundadas de plantas transformadas.

20 Un subgrupo de las líneas R<sub>1</sub> obtenidas en el Ejemplo 13 fue analizado para determinar su resistencia frente a *Macrosiphum euphorbiae* con el fin de identificar cósmidos con el gen de resistencia *Meu-1*. De diez a quince plántulas de cada línea R<sub>1</sub> fueron inoculadas y evaluadas según se describió en el Ejemplo 14. En total, se analizaron 41 líneas R<sub>1</sub> de 7 diferentes transformaciones cósmídicas; 6 cósmidos que llevaban el inserto de ADN del tomate y un cósmido, pJJ04541, sin el inserto de ADN del tomate. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Treinta y seis plantas R<sub>0</sub> transgénicas se consideraron susceptibles, ya que docenas de áfidos proliferaron en todas o en la mayoría de las plantas de cada línea R<sub>1</sub>. Cinco plantas R<sub>0</sub> son resistentes, ya que por lo menos la mitad de las plantas de cada línea R<sub>1</sub> no tuvieron áfidos vivos. Estas 5 plantas R<sub>0</sub> resistentes habían sido todas transformadas con el cósmido Mi-11.

30 Los resultados obtenidos indican firmemente que las plantas R<sub>0</sub> que derivan de transformaciones con el cósmido Mi-11, contienen un gen de resistencia *Meu-1* funcional.

TABLA 4

Cósmido	Número de líneas R <sub>1</sub> de plantas R <sub>0</sub> independientes analizadas				
	Total	Proporción de segregación R:S (resistentes respecto a susceptibles)			
		1:0	3:1	1:1	0:1
Mi-32	4	0	0	0	4
Mi-30	7	0	0	0	7
Mi-11	7	1	2	2	2
Mi-18	7	0	0	0	7
Mi-01	6	0	0	0	6
Mi-14	5	0	0	0	5
pJJ04541	5	0	0	0	5

Una evidencia genética adicional de la presencia del gen de resistencia *Meu-1* en el cósmido Mi-11 se obtuvo en la siguiente generación. Veinticuatro líneas R<sub>2</sub> que habían sido obtenidas de autofecundaciones de plantas R<sub>1</sub> resistentes a nematodos (ver el Ejemplo 13), que se originaron de nueve plantas R<sub>0</sub> diferentes, fueron analizadas para determinar su resistencia frente a *M. euphorbiae*. De once a quince plantones de cada línea R<sub>2</sub> fueron inoculados y evaluados según se describió en el Ejemplo 14. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Una línea R<sub>2</sub> se segregó en una proporción de 3:1 y 8 líneas R<sub>2</sub> se segregaron en una proporción de aproximadamente 1:1. En estas nueve líneas, el fenotipo de resistencia al áfido de la patata es claramente visible. Cinco líneas R<sub>2</sub> parecían ser completamente susceptibles. Las diez líneas R<sub>2</sub> restantes tuvieron una clasificación intermedia: se segregaron en una proporción de aproximadamente 1:3. Estos resultados indican que varias plantas R<sub>1</sub>, que son resistentes a *Meloidogyne incognita* y que derivan de plantas R<sub>0</sub> transformadas con el cósmido Mi-11, tienen un gen de resistencia *Meu-1* funcional.

Además, ocho líneas R<sub>1</sub>BC que fueron obtenidas de plantas R<sub>1</sub> resistentes a nematodos retrocruzadas con la línea de tomate susceptible 52201, fueron analizadas para determinar su resistencia frente a *M. euphorbiae*, con el fin de confirmar la herencia del gen de resistencia *Meu-1* introgresado. De doce a quince plantones de cada línea R<sub>1</sub>BC fueron inoculados y evaluados según se describió en el Ejemplo 14. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Las proporciones de segregación mostradas en la Tabla 5 y en la Tabla 6 sirven solamente para ilustrar la herencia del fenotipo de resistencia.

TABLA 5

Cósmido	Número de líneas R <sub>2</sub> de plantas R <sub>1</sub> independientes analizadas					
	Total	Proporción de segregación R:S (resistentes respecto a susceptibles)				
		1:0	3:1	1:1	1:3	0:1
Mi-11	24	0	1	8	10	5

TABLA 6

Cósmido	Número de líneas R <sub>1</sub> BC de plantas R <sub>1</sub> independientes analizadas					
	Total	1:0	3:1	1:1	1:3	0:1
Mi-11	8	0	1	5	2	0

#### EJEMPLO 16: CONSTRUCCIÓN DE MAPAS DE LOS TRANSCRITOS

Se realizaron estudios de construcción de mapas de los transcritos para crear un mapa de los extremos 5' y 3' del gen de resistencia *Mi* y para determinar si el gen de resistencia *Mi* contiene algún intrón. La reacción en cadena de la polimerasa para amplificar partes de los transcritos del gen de resistencia *Mi* fue utilizada para este fin.

El ARN total del tejido de hojas del cultivo de tomate resistente E22 fue aislado de acuerdo con el método del fenol caliente según está descrito por Sambrook y col. (en: Molecular cloning: a laboratory manual, 1989,

Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se aisló el ARN poli A+ utilizando oligo(dT) biotinilado unido a Dynabeads M-280 Streptavidin (DYNAL A.S., Oslo, Noruega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se construyó una biblioteca de ADNc utilizando el kit "Superscript Rnase H Reverse Transcriptase cDNA" de Life Technologies, Inc, Gaithersburg, MD, EE.UU. y el protocolo suministrado por el fabricante.

5 Se obtuvieron los productos RACE 5' y 3' utilizando el kit de amplificación de ADNc Marathon de Clontech (Palo Alto, CA, EE.UU.). Los cebadores utilizados fueron diseñados sobre la base de la secuencia genómica de *Mi*, y especialmente del extremo 5' de la secuencia codificadora de ORF2. Posteriormente, los diferentes fragmentos 5' y 3'-RACE fueron clonados en el vector de clonaje TA pCRII (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, EE.UU.) y secuenciados utilizando protocolos estándar. Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron alineadas con la secuencia genómica de 9,9 kb y pudieron deducirse dos secuencias intrónicas para el extremo 5' del gen de resistencia *Mi*. Un intrón de 1306 nucleótidos estaba ubicado desde el nucleótido en posición 1936 al nucleótido en posición 3241 y el segundo desde el nucleótido en posición 3305 al 3379 (Figura 5).

15 El transcrito de *Mi* más grande detectado con el kit de amplificación de ADNc Marathon mapea en la posición de nucleótido 1880. Por lo tanto, concluimos que el sitio de inicio de la transcripción de *Mi* está ubicado en o corriente arriba del nucleótido 1880. El primer codón ATG que pudo ser detectado dentro del ADNc 5' estaba situado en la posición de nucleotídica 3263, 52 nucleótidos corriente arriba del segundo intrón, y pudo deducirse un marco de lectura abierto grande (ORF1) que codificaba un polipéptido de 1257 aminoácidos y está mostrado en la Figura 7A. Como resultado, este segundo intrón está ubicado entre el aminoácido 14 y el 15 del producto del gen de resistencia *Mi*.

#### EJEMPLO 17: ANÁLISIS POR PCR DE PLANTAS TRANSFORMADAS CON Mi-11 Y Mi-18

20 Los datos obtenidos del análisis de complementación en raíces de plantas transformadas (Ejemplo 10) indicaban que el gen de resistencia *Mi* estaba ubicado en un segmento de ADN que solapaba entre los cósmidos Mi-11 y Mi-18, excluyendo el segmento de ADN correspondiente al cósmido Mi-30, cuyos transformantes eran todos susceptibles. Se calculó que esta región tenía alrededor de 12 kb. Sin embargo, en el análisis de complementación de las progenies autofecundadas de las plantas transformadas, solamente las plantas transformadas con el cósmido Mi-11 fueron clasificadas como resistentes (Ejemplos 13 y 15). Para resolver la cuestión de porqué las plantas transformadas con Mi-18 eran susceptibles, se realizó un análisis de PCR en presencia o ausencia del supuesto ORF de *Mi* en las plantas transformadas con Mi-11 y Mi-18.

Se analizaron las siguientes muestras de ADN:

1. Clon 2/1256 de YAC.
- 30 2-3. Cósmido Mi-11 en *E. coli* y en *A. tumefaciens*, respectivamente.
- 4-5. Cósmido Mi-18 en *E. coli* y en *A. tumefaciens*, respectivamente.
6. Línea de tomate E22 (resistente).
7. Línea de tomate 52201 (susceptible).
- 8-12. Cinco plantas transformadas con el cósmido Mi-11.
- 35 13-17. Cinco plantas transformadas con el cósmido Mi-18.

40 El ADN fue digerido con *Pst*I y se ligaron adaptadores de *Pst*I. Posteriormente, se realizó un análisis de PCR con un cebador que identificaba el sitio de *Pst*I y tres nucleótidos selectivos adicionales o marcador PM14 y varios cebadores de PCR ubicados corriente arriba de PM14 utilizando el enzima polimerasa *rTh* (kit Gene Amp XL PCR; Perkin Elmer). Los productos generados variaban en tamaño desde 443 a 6110 pb y abarcan la región corriente arriba de PM14 completa del supuesto ORF de *Mi* (ver la Figura 6).

45 Parecía que todos los moldes generaron productos de PCR del tamaño esperado, con la excepción de las cinco plantas transformadas con el cósmido Mi-18. Solamente se formó el producto de PCR más pequeño (443 pb). Estos datos indican que la región corriente arriba de PM14 casi completa no estaba presente en las plantas transformadas con el cósmido Mi-18. Estas deleciones no tienen lugar con el cósmido Mi-18 presente en *E. coli* o *A. tumefaciens*, sino que ocurren solamente en las plantas transformadas. Por lo tanto, concluimos que estas deleciones son responsables del fenotipo susceptible a *Meloidogyne incognita* y/o a *Macrosiphum euphorbiae* de las plantas transformadas con Mi-18.

#### EJEMPLO 18: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL CÓSMIDO Mi-11

50 La observación de que solamente las plantas transformadas con el cósmido Mi-11 mostraban un fenotipo resistente, podría indicar que los marcos de lectura abiertos adicionales presentes en Mi-11 pueden ser candidatos para codificar resistencia frente a nematodos y/o áfidos. Por lo tanto, la secuencia de nucleótido de la región corriente arriba del ORF1 postulado fue determinada para identificar marcos de lectura abiertos adicionales.

Un grupo de subclones aleatorios con un tamaño de inserto de 2 kb fueron aislados utilizando los fragmentos de *Pst*I de 2,1, 4,7 y 2,9 kb del clon cosmídico Mi-11 como sondas de hibridación en la hibridación de

colonias, esencialmente como se describió en el Ejemplo 11.

Cuarenta y nueve clones positivos fueron utilizados para determinar la secuencia de ADN utilizando los cebadores de secuenciación directos e inversos estándar. El ensamblaje de la secuencia y el análisis se realizaron según se describió en el Ejemplo 11.

5 Pudieron deducirse tres tramos contiguos de ADN con tamaños de 5618 pb (con25), 898 pb (con10) y 2495 pb (con62). Los huecos entre estos tramos de ADN y la secuencia de ADN de 9870 pb que contenía el supuesto ORF de *Mi* (Figura 6) fueron calculados utilizando PCR y variaban entre 50 y 200 pb.

10 Los tres contigs determinados (con25, con10 y con62) fueron analizados para determinar la distribución de codones de parada en los seis marcos posibles. No se pudo postular ningún marco ORF significativo con un tamaño de o superior a 120 aminoácidos. Además, no se detectó ninguna homología de ADN con el supuesto ORF1. Por tanto, el único ORF significativo presente en el cósmido Mi-11 era ORF1 según se describe en la Figura 5. Sobre la base de estos resultados, puede concluirse que el polinucleótido codificado por ORF1 confiere resistencia a nematodos, así como a áfidos y, por lo tanto, que el gen de resistencia *Mi* y el gen de resistencia *Meu-1* se refieren a la misma secuencia codificadora que la representada en la Figura 5.

15 **EJEMPLO 19: TRANSFORMACIÓN DE TABACO Y ANÁLISIS DE COMPLEMENTACIÓN**

**Transformación del tabaco**

El cultivo de tabaco Petit Havana, tipo SR1, fue transformado con el cósmido Mi-11 o con el vector cosmídico pJJ04541, utilizando el protocolo descrito por Horsch y col. (Science, 227, 1229-1231, 1985).

20 **Análisis de complementación: selección por resistencia a nematodos en cultivos de raíces de plantas de tabaco transformadas**

25 Se sometieron raíces de plantas de tabaco R<sub>0</sub> transformadas cultivadas *in vitro* al ensayo de enfermedad según se describió en el Ejemplo 1. De cada uno de los 31 transformantes se analizaron dos o más explantes de raíz. Además, los 17 transformantes con Mi-11 fueron todos analizados mediante PCR para determinar la presencia del supuesto ORF1 de *Mi*, seleccionando por un fragmento interno con un tamaño de 823 pares de bases (que se extendía desde el nucleótido en posición 4824 al 5646, ver la Figura 5). Los cebadores de PCR simple para el fragmento fueron deducidos a partir de la secuencia mostrada en la Figura 5. Los cebadores utilizados tienen las siguientes secuencias:

Cebador S21: 5'-CCAAGGACAGAGGTCTAATCG-3'

Cebador S22: 5'-TTGAGGTGATGTGGTAAATGG-3'

30 El cebador S21 está dirigido a la secuencia desde el nucleótido en posición 4824 al 4844 y el cebador S22 está dirigido a la secuencia desde el nucleótido en posición 5626 al 5646 (ver la Figura 5).

35 Los resultados del ensayo de enfermedad *in vitro* y del análisis por PCR (presencia "+" o ausencia "—" del fragmento de PCR interno) se muestran en la Tabla 7. "Mi-11" representa plantas transformadas que contienen el supuesto ORF1 de *Mi* y "Mi-11Δ" representa aquellas plantas transformadas que tienen una delección en el supuesto ORF1 de *Mi*, según se determinó por el análisis de PCR (descrito anteriormente). Veintinueve transformantes R<sub>0</sub> eran susceptibles, ya que se habían formado agallas en al menos uno de los cultivos de raíces analizados. Generalmente, el índice de formación de agallas en las raíces de tabaco es ligeramente menor que en las raíces de tomate susceptible. Dos plantas R<sub>0</sub> se clasificaron como resistentes a *Meloidogyne incognita*, ya que no pudieron encontrarse agallas en los cultivos de raíces. Ambas plantas resistentes fueron transformadas con el cósmido Mi-11 que contenía el fragmento de PCR interno que indicaba la presencia del gen de resistencia *Mi*.

TABLA 7

Genotipo	Fragmento de PCR	Plantas R <sub>0</sub>	
		Resistentes	Susceptibles
Mi-11	+	2	7
Mi-11Δ	-	0	8
pJJ04541	-	0	14

45 **Análisis de complementación: selección por resistencia a áfidos en esquejes de plantas de tabaco transformadas**

Se inocularon y evaluaron esquejes con raíces de plantas R<sub>0</sub> transformadas de tabaco según se describió en el Ejemplo 14. De cada uno de los 23 transformantes se analizaron dos o tres cortes para determinar su

resistencia frente a *Macrosiphum euphorbiae*. Los resultados del ensayo de infección y del análisis de PCR (como se describió anteriormente) se muestran en la Tabla 8. Veintiún plantas R<sub>0</sub> se consideraron susceptibles, ya que se contaron varios áfidos vivos en al menos uno de los esquejes analizados. En general, el nivel de proliferación de los áfidos en el tabaco es bajo comparado con la proliferación en plantas de tomate susceptibles. Dos plantas R<sub>0</sub> se clasificaron como resistentes, ya que todos los esquejes de estas plantas estuvieron sin áfidos vivos. Las plantas resistentes a áfidos fueron transformadas con el cósmido Mi-11, que contenía el gen de resistencia *Mi*, según está indicado por la presencia del fragmento de PCR interno.

TABLA 8

Genotipo	Fragmento de PCR	Plantas R <sub>0</sub>	
		Resistentes	Susceptibles
Mi-11	+	2	3
Mi-11Δ	-	0	6
pJJ04541	-	0	12

## EJEMPLO 20: TRANSFORMACIÓN DE LA PATATA Y ANÁLISIS DE COMPLEMENTACIÓN

### Transformación de la patata

La variedad de patata Diamant (Cebeco Zaden, B.V., Vlijmen, Países Bajos) fue utilizada para la transformación. Se transformaron explantes entre nudos de plantas cultivadas *in vitro* con el cósmido Mi-11 o con el vector cosmidico pJJ04541 utilizando el protocolo descrito por Ooms y col. (Theor. Appl. Genet., 73, 744-750).

### Análisis de complementación: selección por resistencia a nematodos en cultivos de raíces de plantas transformadas

Raíces de plantas de patata R<sub>0</sub> transformadas cultivadas *in vitro* fueron sometidas al ensayo de enfermedad según se describió en el Ejemplo 1. De cada uno de los 31 transformantes se analizaron al menos 2 explantes de raíz. Además, los 26 transformantes con Mi-11 fueron analizados mediante PCR utilizando los cebadores S21 y S22 según se describió en el Ejemplo 19. Los resultados del ensayo de enfermedad *in vitro* y del análisis por PCR (presencia "+" o ausencia "-" del fragmento de PCR interno) se muestran en la Tabla 9. "Mi-11" representa plantas transformadas que contienen el supuesto ORF1 de *Mi* y "Mi-11Δ" representa aquellas plantas transformadas que tienen una delección en el supuesto ORF1 de *Mi*, según se determinó mediante el análisis por PCR (descrito anteriormente). Veintiocho transformantes R<sub>0</sub> fueron susceptibles, ya que se formaron agallas en al menos uno de los cultivos de raíces. Generalmente, la tasa de formación de agallas en raíces de patata es menor que en raíces de tomate susceptibles. Tres plantas R<sub>0</sub> se clasificaron como resistentes a *Meloidogyne incognita*, ya que no pudieron encontrarse agallas en los cultivos de raíces. Todas estas plantas resistentes fueron transformadas con el cósmido Mi-11 que contenía el fragmento de PCR interno que indicaba la presencia del gen de resistencia *Mi*.

TABLA 9

Genotipo	Fragmento de PCR	Plantas R <sub>0</sub>	
		Resistentes	Susceptibles
Mi-11	+	3	17
Mi-11Δ	-	0	6
pJJ04541	-	0	5

### Análisis de complementación: selección por resistencia a nematodos de esquejes de plantas transformadas

Esquejes con raíces de plantas R<sub>0</sub> de patata transformadas con Mi-11 fueron sometidos al ensayo de enfermedad según se describió en el Ejemplo 12. De cada uno de los 19 transformantes, se analizaron de uno a tres esquejes para determinar su resistencia frente a *Meloidogyne incognita*. Los resultados se muestran en la Tabla 10. Además, se analizaron 36 esquejes con raíces de plantas de patata no transformadas (variedad Diamant) (como controles susceptibles) y todos fueron susceptibles. Una planta R<sub>0</sub> fue clasificada como *Meloidogyne incognita*, ya que no pudieron encontrarse agallas en el sistema radicular.

TABLA 10

Genotipo	Fragmento de PCR	Plantas R <sub>0</sub>	
		Resistentes	Susceptibles
Mi-11	+	1	12
Mi-11Δ	-	0	6
Control transf.	no -	0	1

**LISTADO DE SECUENCIAS**

## (1) INFORMACIÓN GENERAL

## 5 (i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: KEYGENE, N.V.

(B) CALLE: Agrobusiness Park, 90

(C) CIUDAD: WAGENINGEN

(E) PAÍS: Países Bajos

10 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 6700 AE

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: RESISTENCIA FRENTE A PLAGAS DE LAS PLANTAS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 19

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disco magnético flexible

15 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, versión #1.30 (EPO)

(v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

NÚMERO DE SOLICITUD: EP XXXXXXXXXX

20 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/EP 97/04340

(B) FECHA DE REGISTRO: 08-AGOSTO-1997

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: EP 96401764.4

25 (B) FECHA DE REGISTRO: 09-AGOSTO-1996

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: EP 97401101.7

(B) FECHA DE REGISTRO: 16-MAYO-1997

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 1:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

- (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"
- 5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1:  
 GACTGCGTAC ATGCAGNN 18
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 2:  
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 19 pares de bases  
 10 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 2:  
 GATGAGTCCT GAGTAANNN 19
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 3:  
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 21 pares de bases  
 20 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"
- 25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 3:  
 CTCGTAGACT GCGTACATGC A 21
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 4:  
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 14 pares de bases  
 30 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"
- 35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 4:  
 CATCTGACGC ATGT 14
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 5:  
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 16 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 5 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 5:  
 GACGATGAGT CCTGAG 16
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 6:  
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 10 (A) LONGITUD: 14 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 15 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 6:  
 TACTCAGGAC TCAT 14
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 7:  
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 20 (A) LONGITUD: 16 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 25 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 7:  
 GACTGCGTAC ATGCAG 16
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 8:  
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 30 (A) LONGITUD: 16 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 35 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 8:  
 GATGAGTCCT GAGTAA 16
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 9:  
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 9:  
 GACTGCGTAC ATGCAGGA 18
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 10:
- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 19 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 10:  
 GATGAGTCCT GAGTAATCT 19
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 11:
- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 16 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 11:  
 GACTGCGTAC CAATTC 16
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 12:
- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 16 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 12:  
 GATGAGTCCT GAGTAA 16
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 13:

	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 21 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE HEBRA: sencilla	
5	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico	
	(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 13:	
	CCAAGGACAG AGGTCTAATC G	21
10	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 14:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 21 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE HEBRA: sencilla	
15	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico	
	(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 14:	
	TTGAGGTGAT GTGGTAAATG G	21
20	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 15:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 9870 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE HEBRA: sencilla	
25	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
	(ix) CARACTERÍSTICA:	
	(A) NOMBRE/CLAVE: CDS	
	(B) LOCALIZACIÓN: 3263..3304	
30	(ix) CARACTERÍSTICA:	
	(C) NOMBRE/CLAVE: CDS	
	(D) LOCALIZACIÓN: 3380..7108	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 15:	
	TTTTCTCTT CATATAACTT TTTCTTAAC CCCTCTCATG AATAATATAA TTGATGTGGA	60
35	TAAAGTATTA TCCTTTATGA TAAATAACGA AATTTAATAA TTTAAAGGGT GCAAATCTAT	120
	AAAATGGAGA CGCACATTGA TAATGTCCTC TTGATTATTA TTAAAGAATT ACTCTAGCTT	180
	CACAAATTTA AATTCATTAA TGCTTAATTA CATGATAAAA ACTTTAGTTG TTCTTTTTAC	240
	ATGGTTTGCT AACTTTAATT TTTTTCTTC ATATTCTTCA TTTGTTTATT ATTATTTTCT	300
	AATTACTTAT TTAACTTTTA TACTCTTAAT ATTCATAACT CTCATCTTTT CATATTCATA	360

ES 2 356 630 T3

	ACCTCCAAAT ATTTAAACTA AAACCTTTAAG ATATCTTTTG ATATTTGTTC AATAATAAAT	420
	TCAACTTCTT TATCTTATGA AACCCCTACC AAGATTATTA GGCTATTATT TTTTATTCTA	480
	TAGTAAAAAC AAATGATGAA GATTCTTGAA TTTTATAGGA TATGAAAGAA GTCGATAAAA	540
	TCTCAGAGAG TTATGTACTA ATTTTGTACT TATTTTTTCA TCTATATATA CATAAATCTT	600
5	ATAAGAATAA TGTCTATATT GTATTTTTTT CTAAATATT ATGTTTCTTT TTAATTTTTT	660
	TTCACTCTGT TAGACTTCTT AATTTAGTTT TCTATGAATG TTTTATTGCC GTAAGTCTTT	720
	GAATTTTGTA ATTGTTACAT TTTATTATTC ATTACGATTT ACATATATAT TTCCATGAGA	780
	TTTGGTCATT CTAACGTATC TATAAAAATT CACATGAAAC ACACGTGTGA AGCGCATCCT	840
	CAGAAAAACT AGTGTATATA TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATATA	900
10	TATATATATA TATATATATA TATATATTAT TCTTATTTAA AAAGAATGTC CTTATTTTCA	960
	TTTTAATCTG GTTAAAAAAG AATAATCTCT TTCCTTTTTT GACAATATTT TAACTTTAAC	1020
	TTTCCACGTA ACATGTTTAA GACAACAAAA TTAATGACA TTTAATCTT GTAACATAGA	1080
	AAAGTAACAT ATGATAATTG TCGTTGTCCC TAAACATGAT AGATGTATAA TTCAAAAGTC	1140
	AATGAATTGT ATTTTAGTAT TATATTATGA ATGAACAAAC TGCAAGATG TGTATATATA	1200
15	TATATATTTT ATTCTTGTTA ATTTGGCCTT TCAAGTAATT AATTCATTGT TAGGCAGTTG	1260
	AATTAATAAT CTCTTTTAGG AATCTTCCCA TGTGAATAAC AAGACTTATA ATAATAATAA	1320
	TAAAGTCCAG ATCTTGTTTC AATTGGATCA TTTGGCAAAC AATTACTCTG TTTCTGAAAC	1380
	AAGGAATAGG GCTTCTAATA TTGTAGGGGA TTTTTTTTTT TTCATTAATT TATACTTATG	1440
	ATATTAATTA TTGTTTTTGA GTACATATTT TAACTCTGT TGTTTATTTT TCTGCAAAGT	1500
20	TTCTCCGGTT ATATTGAACA TATACACATA TAGTACATAT ATTTATTGTA AAAAAAATAA	1560
	TTATTATACT CCATTTCAAG AAATTATGTT TTGATATTAT ATATTAAATT CTATAATGTG	1620
	GAAATTGTCA ATGTCTACAA TGTGTTTGAT GAAATGACAA CCACTTGTTT TTATCTGCAA	1680
	CAGTATAAAA ATTGGCTTTG CTCTTTTATG ATTAATATAA TATTTTACAG GTCACATATT	1740
	ATATTTATAT TGTGAAAGAC AAGAGATATT GATTAAAAAA AGACTTATGG GTTTGTATTT	1800
25	TAATATTTCA TTCTTCTTCA TTAATAAAG ACTTGTATCG TATATTTCAA CTACTACACT	1860
	TGTTTTCTTA TCCAATAGCT TCAACATTAT TTCTCAAACA AAGGGTTCTC TAGCTAAACT	1920
	TCAGCCTGTG TAAAGGTAAC ATCTTCTTTA TTCACAGCAT AATAACAATG AATTTGGTGC	1980
	ATGTTTGAAG TAAGCTTGAA ATTTTCTCTT TCTAAGTTTG TTTGATCCAT TTAGATTCTT	2040
	TTAAATACTT TTGGTATTTA AAGGACTTGT GAAGTCAATG AATTGTATTT TAGTAATCTT	2100
30	GCAATTCTAG ATCTAGCTAT TTGTTGTTCT CCTTCAACC AAACACTTC TTCAATTTGT	2160
	CTAACAAAAA TATGTCAAAA AGGTATGAAC ATGCTTAATC GGAGATCTTT ATTGATTCTA	2220
	CTTCAGCTAC TCTAAAAAAA AATCTTTTTT CCATTAAGCC CAAGTCGAGA TAGGAGAAAA	2280
	ATATTATTAG AGAGATTATT AATTTAATGA CATTTTACTC TAGTTTTTTA TCAAATAAAG	2340
	GGAATAATAT CCTGTTATTT AACTACCTTT TAAGCATTAT GGGTGGAAAG TAGAAAGAAG	2400
35	AAACATAACA GAACAGACAG TAAGTTATGC TTTAATGAGT AGATCTGTAT AGGATTACAT	2460
	ATTTGTTTGA CTTTTCGGTG TTTTCGATTAG AAAACTTACA AGTTTTTAAT ACATGTATCA	2520
	TTTGTGATT TGTCCGTTTG GCACGTCATC TGTGGTTACA AGTCACATAT GAAGTATGTC	2580
	CACGAGACAC ACCGAATGTC AAGTATAGAT TTCTACTTGA TCATACACAA CTTTATCTGA	2640
	GGTTGATGCC AAATTTAAAT GACTACCTAA AGCTGATATT TTAACATTA ATCTTGTACA	2700

ES 2 356 630 T3

CGAAAACATT ATTCCTATTA CTGTTTTCTT TACCTTTACC TTATAGACTT TTTTGGCAGA 2760  
 AAAAAGTTAG ACAGATACAT TTGATGATGT TTACCATTCT CATTCTCTCT TTATTTTATT 2820  
 TTCTTTACAT TCACACGCAC AATAATTTTC TTGTAGGTTT CTTATATGCC ATATGCACAT 2880  
 AGACGAATCT AGGATTTGAT ATTTACAAGT TTCTATGTCTG ACGTCATATT AATATCAATA 2940  
 5 ATAATTAGAT TGACAATCAC ATATTTATAA TATTAAGTCG ATAACCTTCT TCTTTGTATA 3000  
 GGTGGAAAA GTAATGGTAA ACGAGCAGGA CTCCTTTTTC TTTTTTTTGT AAATAATTAA 3060  
 CAGTTGTGAG ATTTTATGTT TGTGACTTCA TGTCATAAAC ATTTTGATGT GTGATTAAGA 3120  
 TTGACATTTT CAATTGTGCG AGTCTAAAAT TACTATATGT GAAAATAGTG ATATTATTGA 3180  
 TTATTCGTAT TTTTTCATCT TCTTCTCCT GTTAAAGTTT TATCTACTTT TTATTCATCA3240  
 10 GGTCTTGAGA AAAAGTAGAA TC ATG GAA AAA CGA AAA GAT ATT GAA GAA GCA 3292  
 Met Glu Lys Arg Lys Asp Ile Glu Glu Ala  
 1 5 10  
 AAC AAC TCA TTG GTATGTTATT TTATAGAGTA AACTGTAAAG TATTGAATTA 3344  
 Asn Asn Ser Leu  
 15 TAGATATGTG GCTTTAAAAT GTATTATTTT GGCAG GTG TTA TTT TCT GCT CTT 3397  
 Val Leu Phe Ser Ala Leu  
 1 5  
 AGC AAG GAC ATT GCC AAT GTT CTA ATT TTC CTA GAG AAT GAG GAA AAT 3445  
 Ser Lys Asp Ile Ala Asn Val Leu Ile Phe Leu Glu Asn Glu Glu Asn  
 20 10 15 20  
 CAA AAA GCT CTT GAC AAA GAT CAA GTT GAA AAG CTA AAA TTG AAA ATG 3493  
 Gln Lys Ala Leu Asp Lys Asp Gln Val Glu Lys Leu Lys Leu Lys Met  
 25 30 35  
 GCA TTT ATT TGT ACA TAT GTT CAG CTT TCT TAT TCC GAT TTT GAG CAG 3541  
 25 Ala Phe Ile Cys Thr Tyr Val Gln Leu Ser Tyr Ser Asp Phe Glu Gln  
 40 45 50  
 TTT GAA GAT ATA ATG ACT AGA AAT AGA CAA GAG GTT GAG AAT CTG CTT 3589  
 Phe Glu Asp Ile Met Thr Arg Asn Arg Gln Glu Val Glu Asn Leu Leu  
 55 60 65 70  
 30 CAA TCA CTT TTG GAT GAT GAT GTC CTT ACT AGC CTC ACC AGT AAT ATG 3637  
 Gln Ser Leu Leu Asp Asp Asp Val Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asn Met  
 75 80 85  
 GAT GAC TGT ATC AGC TTG TAT CAT CGT TCT TAT AAA TCA GAT GCC ATC 3685  
 Asp Asp Cys Ile Ser Leu Tyr His Arg Ser Tyr Lys Ser Asp Ala Ile  
 35 90 95 100

# ES 2 356 630 T3

	ATG ATG GAT GAG CAA TTG GAC TTC CTC CTC TTG AAT CTG TAT CAT CTA	3733
	Met Met Asp Glu Gln Leu Asp Phe Leu Leu Leu Asn Leu Tyr His Leu	
	105            110            115	
	TCC AAG CAT CAC GCT GAA AAG ATA TTT CCT GGA GTG ACT CAA TAT GAA	3781
5	Ser Lys His His Ala Glu Lys Ile Phe Pro Gly Val Thr Gln Tyr Glu	
	120            125            130	
	GTT CTT CAG AAT GTA TGT GGC AAC ATA AGA GAT TTC CAT GGG TTG ATA	3829
	Val Leu Gln Asn Val Cys Gly Asn Ile Arg Asp Phe His Gly Leu Ile	
	135            140            145            150	
10	CTG AAT GGT TGC ATT AAG CAT GAG ATG GTT GAG AAT GTC TTA CCT CTG	3877
	Leu Asn Gly Cys Ile Lys His Glu Met Val Glu Asn Val Leu Pro Leu	
	155            160            165	
	TTT CAA CTC ATG GCT GAA AGA GTA GGA CAC TTC CTT TGG GAG GAT CAG	3925
	Phe Gln Leu Met Ala Glu Arg Val Gly His Phe Leu Trp Glu Asp Gln	
15	170            175            180	
	ACT GAT GAA GAC TCT CGG CTC TCC GAG CTA GAT GAG GAT GAA CAC AAT	3973
	Thr Asp Glu Asp Ser Arg Leu Ser Glu Leu Asp Glu Asp Glu His Asn	
	185            190            195	
	GAT AGA GAC TCT CGA CTC TTC CAG CTA ACA CAT CTA CTC TTG AAG ATT	4021
20	Asp Arg Asp Ser Arg Leu Phe Gln Leu Thr His Leu Leu Leu Lys Ile	
	200            205            210	
	GTT CCA ACT GAA CTG GAG GTT ATG CAC ATA TGT TAT ACA AAT TTG AAA	4069
	Val Pro Thr Glu Leu Glu Val Met His Ile Cys Tyr Thr Asn Leu Lys	
	215            220            225            230	
25	GCT TCA ACT TCA GCA GAA GTT GGA CGC TTC ATT AAG AAG CTC CTG GAA	4117
	Ala Ser Thr Ser Ala Glu Val Gly Arg Phe Ile Lys Lys Leu Leu Glu	
	235            240            245	
	ACC TCA CCG GAT ATT CTC AGA GAA TAT ATC ATT CAA CTA CAA GAG CAT	4165
	Thr Ser Pro Asp Ile Leu Arg Glu Tyr Ile Ile Gln Leu Gln Glu His	
30	250            255            260	
	ATG TTA ACT GTT ATT CCC CCT AGC ACT TTA GGG GCT CGA AAC ATT CAT	4213
	Met Leu Thr Val Ile Pro Pro Ser Thr Leu Gly Ala Arg Asn Ile His	
	265            270            275	

# ES 2 356 630 T3

	GTC ATG ATG GAA TTC CTA TTA CTT ATT CTT TCT GAT ATG CCC AAG GAC	4261
	Val Met Met Glu Phe Leu Leu Leu Ile Leu Ser Asp Met Pro Lys Asp	
	280            285            290	
	TTT ATT CAT CAT GAC AAA CTT TTT GAT CTC TTG GCT CAT GTT GGA ACA 4309	
5	Phe Ile His His Asp Lys Leu Phe Asp Leu Leu Ala His Val Gly Thr	
	295            300            305            310	
	CTT ACC AGG GAG GTA TCG ACT CTT GTA CGT GAC TTG GAA GAG AAA TTA	4357
	Leu Thr Arg Glu Val Ser Thr Leu Val Arg Asp Leu Glu Glu Lys Leu	
	315            320            325	
10	AGG AAT AAA GAG GGT AAT AAC CAA ACA AAT TGT GCA ACC CTA GAC TTG	4405
	Arg Asn Lys Glu Gly Asn Asn Gln Thr Asn Cys Ala Thr Leu Asp Leu	
	330            335            340	
	CTG GAA AAT ATT GAA CTC CTC AAG AAA GAT CTC AAA CAT GTT TAT CTG	4453
	Leu Glu Asn Ile Glu Leu Leu Lys Lys Asp Leu Lys His Val Tyr Leu	
15	345            350            355	
	AAA GCC CCA AAT TCA TCT CAA TGT TGC TTC CCC ATG AGT GAT GGA CCA	4501
	Lys Ala Pro Asn Ser Ser Gln Cys Cys Phe Pro Met Ser Asp Gly Pro	
	360            365            370	
	CTC TTC ATG CAT CTT CTA CAC ATG CAC TTA AAT GAT TTG CTA GAT TCT 4549	
20	Leu Phe Met His Leu Leu His Met His Leu Asn Asp Leu Leu Asp Ser	
	375            380            385            390	
	AAT GCT TAT TCA ATT TCT TTG ATA AAG GAA GAA ATC GAG TTG GTG AGT	4597
	Asn Ala Tyr Ser Ile Ser Leu Ile Lys Glu Glu Ile Glu Leu Val Ser	
	395            400            405	
25	CAA GAA CTG GAA TTC ATA AGA TCA TTC TTT GGG GAT GCT GCT GAG CAA	4645
	Gln Glu Leu Glu Phe Ile Arg Ser Phe Phe Gly Asp Ala Ala Glu Gln	
	410            415            420	
	GGA TTG TAT AAA GAT ATC TGG GCA CGT GTT CTA GAT GTG GCT TAT GAG	4693
	Gly Leu Tyr Lys Asp Ile Trp Ala Arg Val Leu Asp Val Ala Tyr Glu	
30	425            430            435	
	GCA AAA GAT GTC ATA GAT TCA ATT ATT GTT CGA GAT AAT GGT CTC TTA	4741
	Ala Lys Asp Val Ile Asp Ser Ile Ile Val Arg Asp Asn Gly Leu Leu	
	440            445            450	

# ES 2 356 630 T3

	CAT CTT ATT TTC TCA CTT CCC ATT ACC ATA AAG AAG ATC AAA CTT ATC 4789	
	His Leu Ile Phe Ser Leu Pro Ile Thr Ile Lys Lys Ile Lys Leu Ile	
	455            460            465            470	
	AAA GAA GAG ATC TCT GCT TTA GAT GAG AAC ATT CCC AAG GAC AGA GGT	4837
5	Lys Glu Glu Ile Ser Ala Leu Asp Glu Asn Ile Pro Lys Asp Arg Gly	
	475            480            485	
	CTA ATC GTT GTG AAC TCT CCC AAG AAA CCA GTT GAG AGA AAG TCA TTG	4885
	Leu Ile Val Val Asn Ser Pro Lys Lys Pro Val Glu Arg Lys Ser Leu	
	490            495            500	
10	ACA ACT GAT AAA ATA ATT GTA GGT TTT GAG GAG GAG ACA AAC TTG ATA	4933
	Thr Thr Asp Lys Ile Ile Val Gly Phe Glu Glu Glu Thr Asn Leu Ile	
	505            510            515	
	CTT AGA AAG CTC ACC AGT GGA CCC GCA GAT TTA GAT GTC ATT TCG ATC	4981
	Leu Arg Lys Leu Thr Ser Gly Pro Ala Asp Leu Asp Val Ile Ser Ile	
15	520            525            530	
	ACC GGT ATG CCG GGT TCA GGT AAA ACT ACT TTG GCA TAC AAA GTA TAC	5029
	Thr Gly Met Pro Gly Ser Gly Lys Thr Thr Leu Ala Tyr Lys Val Tyr	
	535            540            545            550	
	AAT GAT AAG TCA GTT TCT AGA CAT TTT GAC CTT CGT GCA TGG TGC ACG	5077
20	Asn Asp Lys Ser Val Ser Arg His Phe Asp Leu Arg Ala Trp Cys Thr	
	555            560            565	
	GTC GAT CAA GGA TAT GAC GAC AAG AAG TTG TTG GAT ACA ATT TTC AGT	5125
	Val Asp Gln Gly Tyr Asp Asp Lys Lys Leu Leu Asp Thr Ile Phe Ser	
	570            575            580	
25	CAA GTT AGT GGC TCA GAT TCA AAT TTG AGT GAG AAT ATT GAT GTT GCT	5173
	Gln Val Ser Gly Ser Asp Ser Asn Leu Ser Glu Asn Ile Asp Val Ala	
	585            590            595	
	GAT AAA TTG CGG AAA CAA CTG TTT GGA AAG AGG TAT CTT ATT GTC TTA	5221
	Asp Lys Leu Arg Lys Gln Leu Phe Gly Lys Arg Tyr Leu Ile Val Leu	
30	600            605            610	
	GAT GAT GTG TGG GAT ACT ACT ACA TTG GAT GAG TTG ACA AGA CCT TTT	5269
	Asp Asp Val Trp Asp Thr Thr Thr Leu Asp Glu Leu Thr Arg Pro Phe	
	615            620            625            630	

# ES 2 356 630 T3

	CCT GAA GCT AAG AAA GGA AGT AGG ATT ATT TTG ACA ACT CGA GAA AAG	5317
	Pro Glu Ala Lys Lys Gly Ser Arg Ile Ile Leu Thr Thr Arg Glu Lys	
	635            640            645	
	GAA GTG GCT TTG CAT GGA AAG CTG AAC ACT GAT CCT CTT GAC CTT CGA	5365
5	Glu Val Ala Leu His Gly Lys Leu Asn Thr Asp Pro Leu Asp Leu Arg	
	650            655            660	
	TTG CTA AGA CCA GAT GAA AGT TGG GAA CTT TTA GAG AAA AGG ACA TTT	5413
	Leu Leu Arg Pro Asp Glu Ser Trp Glu Leu Leu Glu Lys Arg Thr Phe	
	665            670            675	
10	GGT AAT GAG AGT TGC CCT GAT GAA CTA TTA GAT GTC GGT AAA GAA ATA	5461
	Gly Asn Glu Ser Cys Pro Asp Glu Leu Leu Asp Val Gly Lys Glu Ile	
	680            685            690	
	GCC GAA AAT TGT AAA GGG CTT CCT TTG GTG GCT GAT CTG ATT GCT GGA	5509
	Ala Glu Asn Cys Lys Gly Leu Pro Leu Val Ala Asp Leu Ile Ala Gly	
15	695            700            705            710	
	GTC ATT GCT GGG AGG GAA AAG AAA AGG AGT GTG TGG CTT GAA GTT CAA	5557
	Val Ile Ala Gly Arg Glu Lys Lys Arg Ser Val Trp Leu Glu Val Gln	
	715            720            725	
	AGT AGT TTG AGT TCT TTT ATT TTG AAC AGT GAA GTG GAA GTG ATG AAA	5605
20	Ser Ser Leu Ser Ser Phe Ile Leu Asn Ser Glu Val Glu Val Met Lys	
	730            735            740	
	GTT ATA GAA TTA AGT TAT GAC CAT TTA CCA CAT CAC CTC AAG CCA TGC	5653
	Val Ile Glu Leu Ser Tyr Asp His Leu Pro His His Leu Lys Pro Cys	
	745            750            755	
25	TTG CTT CAC TTT GCA AGT TGG CCG AAG GAC ACT CCT TTG ACA ATC TAT	5701
	Leu Leu His Phe Ala Ser Trp Pro Lys Asp Thr Pro Leu Thr Ile Tyr	
	760            765            770	
	TTG TTG ACT GTT TAT TTG GGT GCT GAA GGA TTT GTG GAA AAG ACG GAG	5749
	Leu Leu Thr Val Tyr Leu Gly Ala Glu Gly Phe Val Glu Lys Thr Glu	
30	775            780            785            790	
	ATG AAG GGT ATA GAA GAA GTG GTG AAG ATT TAT ATG GAT GAT TTA ATT	5797
	Met Lys Gly Ile Glu Glu Val Val Lys Ile Tyr Met Asp Asp Leu Ile	
	795            800            805	

# ES 2 356 630 T3

	TCC AGT AGC TTG GTA ATT TGT TTC AAT GAG ATA GGT GAT ATA CTG AAT	5845
	Ser Ser Ser Leu Val Ile Cys Phe Asn Glu Ile Gly Asp Ile Leu Asn	
	810            815            820	
	TTC CAA ATT CAT GAT CTT GTG CAT GAC TTT TGT TTG ATA AAA GCA AGA	5893
5	Phe Gln Ile His Asp Leu Val His Asp Phe Cys Leu Ile Lys Ala Arg	
	825            830            835	
	AAG GAA AAT TTG TTT GAT CGG ATA AGA TCA AGT GCT CCA TCA GAT TTG	5941
	Lys Glu Asn Leu Phe Asp Arg Ile Arg Ser Ser Ala Pro Ser Asp Leu	
	840            845            850	
10	TTG CCT CGT CAA ATT ACC ATT GAT TAT GAT GAG GAG GAG GAG CAC TTT	5989
	Leu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Asp Tyr Asp Glu Glu Glu Glu His Phe	
	855            860            865            870	
	GGG CTT AAT TTT GTC ATG TTC GAT TCA AAT AAG AAA AGG CAT TCT GGT	6037
	Gly Leu Asn Phe Val Met Phe Asp Ser Asn Lys Lys Arg His Ser Gly	
15	875            880            885	
	AAA CAC CTC TAT TCT TTG AGG ATA AAT GGA GAC CAG CTG GAT GAC AGT	6085
	Lys His Leu Tyr Ser Leu Arg Ile Asn Gly Asp Gln Leu Asp Asp Ser	
	890            895            900	
	GTT TCT GAT GCA TTT CAC CTA AGA CAC TTG AGG CTT ATT AGA GTG TTG	6133
20	Val Ser Asp Ala Phe His Leu Arg His Leu Arg Leu Ile Arg Val Leu	
	905            910            915	
	GAC CTG GAA CCC TCT TTA ATC ATG GTG AAT GAT TCT TTG CTG AAT GAA	6181
	Asp Leu Glu Pro Ser Leu Ile Met Val Asn Asp Ser Leu Leu Asn Glu	
	920            925            930	
25	ATA TGC ATG TTG AAT CAT TTG AGG TAC TTA AGA ATT CGG ACA CAA GTT	6229
	Ile Cys Met Leu Asn His Leu Arg Tyr Leu Arg Ile Arg Thr Gln Val	
	935            940            945            950	
	AAA TAT CTG CCT TTC TCT TTC TCA AAC CTC TGG AAT CTA GAA AGT CTG	6277
	Lys Tyr Leu Pro Phe Ser Phe Ser Asn Leu Trp Asn Leu Glu Ser Leu	
30	955            960            965	
	TTT GTG TCT AAC AAA GGA TCA ATC TTG GTA CTA TTA CCG AGA ATT TTG	6325
	Phe Val Ser Asn Lys Gly Ser Ile Leu Val Leu Leu Pro Arg Ile Leu	
	970            975            980	

# ES 2 356 630 T3

	GAT CTT GTA AAG TTG CGA GTG CTG TCC GTG GGT GCT TGT TCT TTC TTT	6373
	Asp Leu Val Lys Leu Arg Val Leu Ser Val Gly Ala Cys Ser Phe Phe	
	985            990            995	
	GAT ATG GAT GCA GAT GAA TCA ATA TTG ATA GCA AAG GAC ACA AAG TTA	6421
5	Asp Met Asp Ala Asp Glu Ser Ile Leu Ile Ala Lys Asp Thr Lys Leu	
	1000            1005            1010	
	GAG AAC TTG AGA ATA TTA GGG GAA CTG TTG ATT TCC TAT TCG AAA GAT	6469
	Glu Asn Leu Arg Ile Leu Gly Glu Leu Leu Ile Ser Tyr Ser Lys Asp	
	1015            1020            1025            1030	
10	ACA ATG AAT ATT TTC AAA AGG TTT CCC AAT CTT CAG GTG CTT CAG TTT	6517
	Thr Met Asn Ile Phe Lys Arg Phe Pro Asn Leu Gln Val Leu Gln Phe	
	1035            1040            1045	
	GAA CTC AAG GAG TCA TGG GAT TAT TCA ACA GAG CAA CAT TGG TTC CCG	6565
	Glu Leu Lys Glu Ser Trp Asp Tyr Ser Thr Glu Gln His Trp Phe Pro	
15	1050            1055            1060	
	AAA TTG GAT TGC CTA ACT GAA CTA GAA ACA CTC TGT GTA GGT TTT AAA	6613
	Lys Leu Asp Cys Leu Thr Glu Leu Glu Thr Leu Cys Val Gly Phe Lys	
	1065            1070            1075	
	AGT TCA AAC ACA AAC CAC TGT GGG TCC TCT GTT GCG ACA AAT CGG CCG	6661
20	Ser Ser Asn Thr Asn His Cys Gly Ser Ser Val Ala Thr Asn Arg Pro	
	1080            1085            1090	
	TGG GAT TTT CAC TTC CCT TCA AAT TTG AAA GAA CTG TTG TTG TAT GAC	6709
	Trp Asp Phe His Phe Pro Ser Asn Leu Lys Glu Leu Leu Leu Tyr Asp	
	1095            1100            1105            1110	
25	TTT CCT CTG ACA TCC GAT TCA CTA TCA ACA ATA GCG AGA CTG CCC AAC	6757
	Phe Pro Leu Thr Ser Asp Ser Leu Ser Thr Ile Ala Arg Leu Pro Asn	
	1115            1120            1125	
	CTT GAA AAT TTG TCC CTT TAT GAT ACA ATC ATC CAG GGA GAA GAA TGG	6805
	Leu Glu Asn Leu Ser Leu Tyr Asp Thr Ile Ile Gln Gly Glu Glu Trp	
30	1130            1135            1140	
	AAC ATG GGG GAG GAA GAC ACT TTT GAG AAT CTC AAA TTT TTG AAC TTG	6853
	Asn Met Gly Glu Glu Asp Thr Phe Glu Asn Leu Lys Phe Leu Asn Leu	
	1145            1150            1155	
	CGT CTA CTG ACT CTT TCC AAG TGG GAG GTT GGA GAG GAA TCC TTC CCC	6901
35	Arg Leu Leu Thr Leu Ser Lys Trp Glu Val Gly Glu Glu Ser Phe Pro	
	1160            1165            1170	
	AAT CTT GAG AAA TTA AAA CTG CAG GAA TGT GGT AAG CTT GAG GAG ATT	6949
	Asn Leu Glu Lys Leu Lys Leu Gln Glu Cys Gly Lys Leu Glu Glu Ile	
	1175            1180            1185            1190	

ES 2 356 630 T3

CCA CCT AGT TTT GGA GAT ATT TAT TCA TTG AAA TTT ATC AAA ATT GTA 6997  
Pro Pro Ser Phe Gly Asp Ile Tyr Ser Leu Lys Phe Ile Lys Ile Val  
1195 1200 1205  
AAG AGT CCT CAA CTT GAA GAT TCT GCT CTC AAG ATT AAG AAA TAC GCT 7045  
5 Lys Ser Pro Gln Leu Glu Asp Ser Ala Leu Lys Ile Lys Lys Tyr Ala  
1210 1215 1220  
GAA GAT ATG AGA GGA GGG AAC GAG CTT CAG ATC CTT GGC CAG AGG AAT 7093  
Glu Asp Met Arg Gly Gly Asn Glu Leu Gln Ile Leu Gly Gln Lys Asn  
1225 1230 1235  
10 ATC CCC TTA TTT AAG TAGCATTITG GTTGAACITG GCTTGGTGAT ATTGTATATG 7148  
Ile Pro Leu Phe Lys  
1240  
ATTAAAATAT CCTGTGATGA GATTCCCTCTT AGTTTCTITTT AACAAAAAAT ATAATITTTTA 7208  
TAAGTACACA TATCGTITTTGT TAATITTTGTCC ATITTTGTGATT GCAAGTCACA CATGAGGTAT 7268  
15 GTTCGTATTA TGGGITTTCAA CTTGATCAGA CGTAATITTTA AGATAAGTGC TTATATGATG 7328  
TTGCATGCCA GATGGAAGTG ACTATGTGAA GTTTATATITTT TAAACATTAA TCTTGTATAC 7388  
CAAACACTA TTCCTATGCT ATGITTTGTTG CCATTGTCTG TCTCTCTTTA TITTTTTITCT 7448  
TTCCATTAC ACACACATTA ATITTTCTAGT AGACCGCATA TTACTACATC TGTATTGTCC 7508  
GTATACAAGA CGAATCCAGG ATITTTGATGTT TACAAGTATT TGTGAAGAAT CCAGGATITTG 7568  
20 ATGITTTACAA GACAATTAGA TTCATATATG TATAGGATITTT TGACAGAAAC TGAGGGATTC 7628  
ACATGACAAT TACTCTGTGG ATITTTGCCTITTT GGCTGTCCAA ACCTCCTITTTG TGTCTAACTT 7688  
CGTCTGAAGT CCCATITTTATA TGCTCAAAGC TCAGTCAAGG TACTGATTC AAGCTAGGC 7748  
TGTGAAGTAA ACTITTTAAAAT GATATTTGCTG CAAAGTCTGCT CAACAAAGGG TCATAACCAT 7808  
CACTACAAC ACACAAGCTC AAGCAAGTAA ACGCGGGTGA AAGATTAACA TAGATCGCTA 7868  
25 TCCCCTGCAA AAGCTAAGGA AAGCATCTCT AACTTCTTAG CATGTACTCA AACACACGAT 7928  
CTGTAAGGAT GCCAGAAAGA GAAAGTTACG TTGCCGCAAT TCCTTACAGT GTTGACAAAT 7988  
GTCCCCAAAA CCAACATCAC ACTACAAAAA AAGGCTCAA TTCTGGGGGT TATAATTAGA 8048  
CGGTCAATAA CCCCTGCAAT TTAGTGTTGT GGAGGTTGAA TAACTCCTC CAATTAGGAG 8108  
TGTCACAATT AAGTCGCTG GGATTTCTTG CACATCCCG TAAGGTTAAC TAGCGGGGGT 8168  
30 TTTGAACCCC AACCGCATTT CAAACTAGGA GTCGAAACCC CAACGATITTTG TGAACCTCGGG 8228  
GGAGTCAAAA ACCCCCGCAA TAAATGATITTT TTACATTAATA ATTAATAGGA GCTTGGACCC 8288  
CTGTGATTTA TGAAATATAA CTTTTTGTAG CATTTGCCAG AAATATTTCAA TITTTAGATAC 8348  
TAATAATAAAA TTAATTAAC AACATGTGCA TCATTATTTCA AAGGACATAT TAGTATTAAG 8408  
AAATAATACA ATATTCAACA CAAAAGTACC CAAACTCAAG ATAGGATCAG TTTATGGAAC 8468  
35 TTCAACTAGT TTCACTATAA TTATTGTCAC TAACATCAGC TGGCTGCAA GGAGAATACA 8528  
TAATAAGTGA CTTTATCCAA ACTCAAAATC ATGGCTGAAT GTAGTAAAAAC ACCAAAGATT 8588  
ATAATAATTT CCATTAATTA TCATATACTA CACAACAACA AACTTAAAAAC AATATAGAAA 8648  
AGGATTA AAC CATTACACA AGCAATGATT CTATACCATT TCAAAACGAC AACATACTGT 8708  
ACTACTAAC AAGACACCAT CAAACTGATT TGGACAAATA TTAACAATAG TTA AACATG 8768

AACAAAGAAT CTCAGGTTTC TTGTCAGTAG AAAAGAGACA GACTAGGAAC TGGAGTGCTA 8828  
TTTTTCTTAT AAGAGACAAT TAATGTTTAC TTCTTTATAT TTTGACTATA AGTTGATTGG 8888  
TTATAATGTT TACGAGGTTG TATATAATCC GATGTTCAAT GATATGACTT TCCTATTGAC 8948  
TGAAATGCTT GAACGCAAAC AGTATATCTA GATTAAGAAT GAGGACGAAT TACCTCTAGA 9008  
5 GGCATGGGTA ATGGAAGCAT AACTCCTTGA TAATGGTTGT TAGCCCACTG CAAGTCACAA 9068  
AACAAAACAT CCGTAATATT AACATACTAA GGTTGTAAGC ACTAAACGAC AACAACTATG 9128  
CCTCAATCCC AACTAAGTTG GAATCGACTA TATGAATACT CACAATTTTCG ATTTATAGAC 9188  
AAAGATACTA GTAGAAATGA CGTCTTTCCT TTCTATGTTA ACACTTGGAC AGAGAATGTT 9248  
AAAGACTTAC AACAAACAGAA AAGAGTTAAA ATCATTAAAT TGAGCAAGGA TTTCAAAACG 9308  
10 ACAACACAAT ATACTCAATT TTTTCGACGGA AACAACTGGT TGGACAACAG TGCTATTTGT 9368  
AACTCCAATG AACAACTAGT CAACGTACAT GTATCTCATT GCACTAAATA AATCCCCTTG 9428  
AGAGTAACAT ATCAATAGTT ACGAACAATA TGATCACGAC AAAGGATTGT AAGTACCACA 9488  
GGACAAGTCA TGCTTGCATG AAAAACGGAT ATGTAAAGAA CCAAAATCCT GCTGCTGAAA 9548  
TAAGCAGTTA TGATTATCCA AAAATCATGA ATACACATGC ACTTGAGTTT GTTCCAAGAA 9608  
15 AAACACAACC AACTACTGTC GCAAGTGAAG ATTCAAAAGT GACTATTGAT GTTAATTCTT 9668  
CCACAAGGTT GAATAATTTT GTCACTATAG GATTTAAGAC GAAGAAGAAA CAGGCGACAA 9728  
TTTTGTAAGC ATAGACCTTC TTATGCAACT ATGAGCTGGT ATGCTATTCA TTTTCTTTAC 9788  
TCGTA AAAAAT CGTTGATACT AAAGAATGCC AATCCAGTCC TGCTGAATAG GCGCCAGGTG 9848  
ACTGGTTGCT GTTAATAATT TT 9870

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 16:

Met Glu Lys Arg Lys Asp Ile Glu Glu Ala Asn Asn Ser Leu

1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 17:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1243 aminoácidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 17:

Val Leu Phe Ser Ala Leu Ser Lys Asp Ile Ala Asn Val Leu Ile Phe

1 5 10 15

Leu Glu Asn Glu Glu Asn Gln Lys Ala Leu Asp Lys Asp Gln Val Glu

20 25 30

# ES 2 356 630 T3

Lys Leu Lys Leu Lys Met Ala Phe Ile Cys Thr Tyr Val Gln Leu Ser  
           35          40          45  
 Tyr Ser Asp Phe Glu Gln Phe Glu Asp Ile Met Thr Arg Asn Arg Gln  
           50          55          60  
 5 Glu Val Glu Asn Leu Leu Gln Ser Leu Leu Asp Asp Asp Val Leu Thr  
       65          70          75          80  
 Ser Leu Thr Ser Asn Met Asp Asp Cys Ile Ser Leu Tyr His Arg Ser  
           85          90          95  
 Tyr Lys Ser Asp Ala Ile Met Met Asp Glu Gln Leu Asp Phe Leu Leu  
 10          100          105          110  
 Leu Asn Leu Tyr His Leu Ser Lys His His Ala Glu Lys Ile Phe Pro  
           115          120          125  
 Gly Val Thr Gln Tyr Glu Val Leu Gln Asn Val Cys Gly Asn Ile Arg  
           130          135          140  
 15 Asp Phe His Gly Leu Ile Leu Asn Gly Cys Ile Lys His Glu Met Val  
       145          150          155          160  
 Glu Asn Val Leu Pro Leu Phe Gln Leu Met Ala Glu Arg Val Gly His  
           165          170          175  
 Phe Leu Trp Glu Asp Gln Thr Asp Glu Asp Ser Arg Leu Ser Glu Leu  
 20          180          185          190  
 Asp Glu Asp Glu His Asn Asp Arg Asp Ser Arg Leu Phe Gln Leu Thr  
       195          200          205  
 His Leu Leu Lys Ile Val Pro Thr Glu Leu Glu Val Met His Ile  
           210          215          220  
 25 Cys Tyr Thr Asn Leu Lys Ala Ser Thr Ser Ala Glu Val Gly Arg Phe  
       225          230          235          240  
 Ile Lys Lys Leu Leu Glu Thr Ser Pro Asp Ile Leu Arg Glu Tyr Ile  
           245          250          255  
 Ile Gln Leu Gln Glu His Met Leu Thr Val Ile Pro Pro Ser Thr Leu  
 30          260          265          270  
 Gly Ala Arg Asn Ile His Val Met Met Glu Phe Leu Leu Leu Ile Leu  
       275          280          285  
 Ser Asp Met Pro Lys Asp Phe Ile His His Asp Lys Leu Phe Asp Leu  
       290          295          300  
 35 Leu Ala His Val Gly Thr Leu Thr Arg Glu Val Ser Thr Leu Val Arg  
       305          310          315          320  
 Asp Leu Glu Glu Lys Leu Arg Asn Lys Glu Gly Asn Asn Gln Thr Asn  
           325          330          335  
 Cys Ala Thr Leu Asp Leu Leu Glu Asn Ile Glu Leu Leu Lys Lys Asp

# ES 2 356 630 T3

340            345            350  
 Leu Lys His Val Tyr Leu Lys Ala Pro Asn Ser Ser Gln Cys Cys Phe  
 355            360            365  
 Pro Met Ser Asp Gly Pro Leu Phe Met His Leu Leu His Met His Leu  
 5            370            375            380  
 Asn Asp Leu Leu Asp Ser Asn Ala Tyr Ser Ile Ser Leu Ile Lys Glu  
 385            390            395            400  
 Glu Ile Glu Leu Val Ser Gln Glu Leu Glu Phe Ile Arg Ser Phe Phe  
 405            410            415  
 10            Gly Asp Ala Ala Glu Gln Gly Leu Tyr Lys Asp Ile Trp Ala Arg Val  
 420            425            430  
 Leu Asp Val Ala Tyr Glu Ala Lys Asp Val Ile Asp Ser Ile Ile Val  
 435            440            445  
 Arg Asp Asn Gly Leu Leu His Leu Ile Phe Ser Leu Pro Ile Thr Ile  
 15            450            455            460  
 Lys Lys Ile Lys Leu Ile Lys Glu Glu Ile Ser Ala Leu Asp Glu Asn  
 465            470            475            480  
 Ile Pro Lys Asp Arg Gly Leu Ile Val Val Asn Ser Pro Lys Lys Pro  
 485            490            495  
 20            Val Glu Arg Lys Ser Leu Thr Thr Asp Lys Ile Ile Val Gly Phe Glu  
 500            505            510  
 Glu Glu Thr Asn Leu Ile Leu Arg Lys Leu Thr Ser Gly Pro Ala Asp  
 515            520            525  
 Leu Asp Val Ile Ser Ile Thr Gly Met Pro Gly Ser Gly Lys Thr Thr  
 25            530            535            540  
 Leu Ala Tyr Lys Val Tyr Asn Asp Lys Ser Val Ser Arg His Phe Asp  
 545            550            555            560  
 Leu Arg Ala Trp Cys Thr Val Asp Gln Gly Tyr Asp Asp Lys Lys Leu  
 565            570            575  
 30            Leu Asp Thr Ile Phe Ser Gln Val Ser Gly Ser Asp Ser Asn Leu Ser  
 580            585            590  
 Glu Asn Ile Asp Val Ala Asp Lys Leu Arg Lys Gln Leu Phe Gly Lys  
 595            600            605  
 Arg Tyr Leu Ile Val Leu Asp Asp Val Trp Asp Thr Thr Thr Leu Asp  
 35            610            615            620  
 Glu Leu Thr Arg Pro Phe Pro Glu Ala Lys Lys Gly Ser Arg Ile Ile  
 625            630            635            640  
 Leu Thr Thr Arg Glu Lys Glu Val Ala Leu His Gly Lys Leu Asn Thr  
 645            650            655

# ES 2 356 630 T3

Asp Pro Leu Asp Leu Arg Leu Leu Arg Pro Asp Glu Ser Trp Glu Leu  
           660          665          670  
 Leu Glu Lys Arg Thr Phe Gly Asn Glu Ser Cys Pro Asp Glu Leu Leu  
           675          680          685  
 5 Asp Val Gly Lys Glu Ile Ala Glu Asn Cys Lys Gly Leu Pro Leu Val  
           690          695          700  
 Ala Asp Leu Ile Ala Gly Val Ile Ala Gly Arg Glu Lys Lys Arg Ser  
 705          710          715          720  
 Val Trp Leu Glu Val Gln Ser Ser Leu Ser Ser Phe Ile Leu Asn Ser  
 10          725          730          735  
 Glu Val Glu Val Met Lys Val Ile Glu Leu Ser Tyr Asp His Leu Pro  
           740          745          750  
 His His Leu Lys Pro Cys Leu Leu His Phe Ala Ser Trp Pro Lys Asp  
           755          760          765  
 15 Thr Pro Leu Thr Ile Tyr Leu Leu Thr Val Tyr Leu Gly Ala Glu Gly  
           770          775          780  
 Phe Val Glu Lys Thr Glu Met Lys Gly Ile Glu Glu Val Val Lys Ile  
 785          790          795          800  
 Tyr Met Asp Asp Leu Ile Ser Ser Ser Leu Val Ile Cys Phe Asn Glu  
 20          805          810          815  
 Ile Gly Asp Ile Leu Asn Phe Gln Ile His Asp Leu Val His Asp Phe  
           820          825          830  
 Cys Leu Ile Lys Ala Arg Lys Glu Asn Leu Phe Asp Arg Ile Arg Ser  
           835          840          845  
 25 Ser Ala Pro Ser Asp Leu Leu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Asp Tyr Asp  
           850          855          860  
 Glu Glu Glu Glu His Phe Gly Leu Asn Phe Val Met Phe Asp Ser Asn  
 865          870          875          880  
 Lys Lys Arg His Ser Gly Lys His Leu Tyr Ser Leu Arg Ile Asn Gly  
 30          885          890          895  
 Asp Gln Leu Asp Asp Ser Val Ser Asp Ala Phe His Leu Arg His Leu  
           900          905          910  
 Arg Leu Ile Arg Val Leu Asp Leu Glu Pro Ser Leu Ile Met Val Asn  
           915          920          925  
 35 Asp Ser Leu Leu Asn Glu Ile Cys Met Leu Asn His Leu Arg Tyr Leu  
           930          935          940  
 Arg Ile Arg Thr Gln Val Lys Tyr Leu Pro Phe Ser Phe Ser Asn Leu  
 945          950          955          960  
 Trp Asn Leu Glu Ser Leu Phe Val Ser Asn Lys Gly Ser Ile Leu Val

# ES 2 356 630 T3

	965	970	975
	Leu Leu Pro Arg Ile Leu Asp Leu Val Lys Leu Arg Val Leu Ser Val		
	980	985	990
	Gly Ala Cys Ser Phe Phe Asp Met Asp Ala Asp Glu Ser Ile Leu Ile		
5	995	1000	1005
	Ala Lys Asp Thr Lys Leu Glu Asn Leu Arg Ile Leu Gly Glu Leu Leu		
	1010	1015	1020
	Ile Ser Tyr Ser Lys Asp Thr Met Asn Ile Phe Lys Arg Phe Pro Asn		
	1025	1030	1035
10	Leu Gln Val Leu Gln Phe Glu Leu Lys Glu Ser Trp Asp Tyr Ser Thr		
	1045	1050	1055
	Glu Gln His Trp Phe Pro Lys Leu Asp Cys Leu Thr Glu Leu Glu Thr		
	1060	1065	1070
	Leu Cys Val Gly Phe Lys Ser Ser Asn Thr Asn His Cys Gly Ser Ser		
15	1075	1080	1085
	Val Ala Thr Asn Arg Pro Trp Asp Phe His Phe Pro Ser Asn Leu Lys		
	1090	1095	1100
	Glu Leu Leu Leu Tyr Asp Phe Pro Leu Thr Ser Asp Ser Leu Ser Thr		
	1105	1110	1115
20	Ile Ala Arg Leu Pro Asn Leu Glu Asn Leu Ser Leu Tyr Asp Thr Ile		
	1125	1130	1135
	Ile Gln Gly Glu Glu Trp Asn Met Gly Glu Glu Asp Thr Phe Glu Asn		
	1140	1145	1150
	Leu Lys Phe Leu Asn Leu Arg Leu Leu Thr Leu Ser Lys Trp Glu Val		
25	1155	1160	1165
	Gly Glu Glu Ser Phe Pro Asn Leu Glu Lys Leu Lys Leu Gln Glu Cys		
	1170	1175	1180
	Gly Lys Leu Glu Glu Ile Pro Pro Ser Phe Gly Asp Ile Tyr Ser Leu		
	1185	1190	1195
30	Lys Phe Ile Lys Ile Val Lys Ser Pro Gln Leu Glu Asp Ser Ala Leu		
	1205	1210	1215
	Lys Ile Lys Lys Tyr Ala Glu Asp Met Arg Gly Gly Asn Glu Leu Gln		
	1220	1225	1230
	Ile Leu Gly Gln Lys Asn Ile Pro Leu Phe Lys		
35	1235	1240	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1257 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 18:

5 Met Glu Lys Arg Lys Asp Ile Glu Glu Ala Asn Asn Ser Leu Val Leu  
1 5 10 15  
Phe Ser Ala Leu Ser Lys Asp Ile Ala Asn Val Leu Ile Phe Leu Glu  
20 25 30  
Asn Glu Glu Asn Gln Lys Ala Leu Asp Lys Asp Gln Val Glu Lys Leu  
10 35 40 45  
Lys Leu Lys Met Ala Phe Ile Cys Thr Tyr Val Gln Leu Ser Tyr Ser  
50 55 60  
Asp Phe Glu Gln Phe Glu Asp Ile Met Thr Arg Asn Arg Gln Glu Val  
65 70 75 80  
15 Glu Asn Leu Leu Gln Ser Leu Leu Asp Asp Asp Val Leu Thr Ser Leu  
85 90 95  
Thr Ser Asn Met Asp Asp Cys Ile Ser Leu Tyr His Arg Ser Tyr Lys  
100 105 110  
Ser Asp Ala Ile Met Met Asp Glu Gln Leu Asp Phe Leu Leu Leu Asn  
20 115 120 125  
Leu Tyr His Leu Ser Lys His His Ala Glu Lys Ile Phe Pro Gly Val  
130 135 140  
Thr Gln Tyr Glu Val Leu Gln Asn Val Cys Gly Asn Ile Arg Asp Phe  
145 150 155 160  
25 His Gly Leu Ile Leu Asn Gly Cys Ile Lys His Glu Met Val Glu Asn  
165 170 175  
Val Leu Pro Leu Phe Gln Leu Met Ala Glu Arg Val Gly His Phe Leu  
180 185 190  
Trp Glu Asp Gln Thr Asp Glu Asp Ser Arg Leu Ser Glu Leu Asp Glu  
30 195 200 205  
Asp Glu His Asn Asp Arg Asp Ser Arg Leu Phe Gln Leu Thr His Leu  
210 215 220  
Leu Leu Lys Ile Val Pro Thr Glu Leu Glu Val Met His Ile Cys Tyr  
225 230 235 240  
35 Thr Asn Leu Lys Ala Ser Thr Ser Ala Glu Val Gly Arg Phe Ile Lys  
245 250 255  
Lys Leu Leu Glu Thr Ser Pro Asp Ile Leu Arg Glu Tyr Ile Ile Gln  
260 265 270  
Leu Gln Glu His Met Leu Thr Val Ile Pro Pro Ser Thr Leu Gly Ala

# ES 2 356 630 T3

	275	280	285	
	Arg Asn Ile His Val Met Met Glu Phe Leu Leu Leu Ile Leu Ser Asp			
	290	295	300	
	Met Pro Lys Asp Phe Ile His His Asp Lys Leu Phe Asp Leu Leu Ala			
5	305	310	315	320
	His Val Gly Thr Leu Thr Arg Glu Val Ser Thr Leu Val Arg Asp Leu			
	325	330	335	
	Glu Glu Lys Leu Arg Asn Lys Glu Gly Asn Asn Gln Thr Asn Cys Ala			
10	340	345	350	
	Thr Leu Asp Leu Leu Glu Asn Ile Glu Leu Leu Lys Lys Asp Leu Lys			
	355	360	365	
	His Val Tyr Leu Lys Ala Pro Asn Ser Ser Gln Cys Cys Phe Pro Met			
	370	375	380	
	Ser Asp Gly Pro Leu Phe Met His Leu Leu His Met His Leu Asn Asp			
15	385	390	395	400
	Leu Leu Asp Ser Asn Ala Tyr Ser Ile Ser Leu Ile Lys Glu Glu Ile			
	405	410	415	
	Glu Leu Val Ser Gln Glu Leu Glu Phe Ile Arg Ser Phe Phe Gly Asp			
20	420	425	430	
	Ala Ala Glu Gln Gly Leu Tyr Lys Asp Ile Trp Ala Arg Val Leu Asp			
	435	440	445	
	Val Ala Tyr Glu Ala Lys Asp Val Ile Asp Ser Ile Ile Val Arg Asp			
	450	455	460	
	Asn Gly Leu Leu His Leu Ile Phe Ser Leu Pro Ile Thr Ile Lys Lys			
25	465	470	475	480
	Ile Lys Leu Ile Lys Glu Glu Ile Ser Ala Leu Asp Glu Asn Ile Pro			
	485	490	495	
	Lys Asp Arg Gly Leu Ile Val Val Asn Ser Pro Lys Lys Pro Val Glu			
30	500	505	510	
	Arg Lys Ser Leu Thr Thr Asp Lys Ile Ile Val Gly Phe Glu Glu Glu			
	515	520	525	
	Thr Asn Leu Ile Leu Arg Lys Leu Thr Ser Gly Pro Ala Asp Leu Asp			
	530	535	540	
	Val Ile Ser Ile Thr Gly Met Pro Gly Ser Gly Lys Thr Thr Leu Ala			
35	545	550	555	560
	Tyr Lys Val Tyr Asn Asp Lys Ser Val Ser Arg His Phe Asp Leu Arg			
	565	570	575	
	Ala Trp Cys Thr Val Asp Gln Gly Tyr Asp Asp Lys Lys Leu Leu Asp			
	580	585	590	

# ES 2 356 630 T3

Thr Ile Phe Ser Gln Val Ser Gly Ser Asp Ser Asn Leu Ser Glu Asn  
 595            600            605  
 Ile Asp Val Ala Asp Lys Leu Arg Lys Gln Leu Phe Gly Lys Arg Tyr  
 610            615            620  
 5    Leu Ile Val Leu Asp Asp Val Trp Asp Thr Thr Thr Leu Asp Glu Leu  
 625            630            635            640  
 Thr Arg Pro Phe Pro Glu Ala Lys Lys Gly Ser Arg Ile Ile Leu Thr  
 645            650            655  
 Thr Arg Glu Lys Glu Val Ala Leu His Gly Lys Leu Asn Thr Asp Pro  
 10            660            665            670  
 Leu Asp Leu Arg Leu Leu Arg Pro Asp Glu Ser Trp Glu Leu Leu Glu  
 675            680            685  
 Lys Arg Thr Phe Gly Asn Glu Ser Cys Pro Asp Glu Leu Leu Asp Val  
 690            695            700  
 15    Gly Lys Glu Ile Ala Glu Asn Cys Lys Gly Leu Pro Leu Val Ala Asp  
 705            710            715            720  
 Leu Ile Ala Gly Val Ile Ala Gly Arg Glu Lys Lys Arg Ser Val Trp  
 725            730            735  
 Leu Glu Val Gln Ser Ser Leu Ser Ser Phe Ile Leu Asn Ser Glu Val  
 20            740            745            750  
 Glu Val Met Lys Val Ile Glu Leu Ser Tyr Asp His Leu Pro His His  
 755            760            765  
 Leu Lys Pro Cys Leu Leu His Phe Ala Ser Trp Pro Lys Asp Thr Pro  
 770            775            780  
 25    Leu Thr Ile Tyr Leu Leu Thr Val Tyr Leu Gly Ala Glu Gly Phe Val  
 785            790            795            800  
 Glu Lys Thr Glu Met Lys Gly Ile Glu Glu Val Val Lys Ile Tyr Met  
 805            810            815  
 Asp Asp Leu Ile Ser Ser Ser Leu Val Ile Cys Phe Asn Glu Ile Gly  
 30            820            825            830  
 Asp Ile Leu Asn Phe Gln Ile His Asp Leu Val His Asp Phe Cys Leu  
 835            840            845  
 Ile Lys Ala Arg Lys Glu Asn Leu Phe Asp Arg Ile Arg Ser Ser Ala  
 850            855            860  
 35    Pro Ser Asp Leu Leu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Asp Tyr Asp Glu Glu  
 865            870            875            880  
 Glu Glu His Phe Gly Leu Asn Phe Val Met Phe Asp Ser Asn Lys Lys  
 885            890            895  
 Arg His Ser Gly Lys His Leu Tyr Ser Leu Arg Ile Asn Gly Asp Gln

# ES 2 356 630 T3

	900	905	910
	Leu Asp Asp Ser Val Ser Asp Ala Phe His Leu Arg His Leu Arg Leu		
	915	920	925
	Ile Arg Val Leu Asp Leu Glu Pro Ser Leu Ile Met Val Asn Asp Ser		
5	930	935	940
	Leu Leu Asn Glu Ile Cys Met Leu Asn His Leu Arg Tyr Leu Arg Ile		
	945	950	955
	960		
	Arg Thr Gln Val Lys Tyr Leu Pro Phe Ser Phe Ser Asn Leu Trp Asn		
	965	970	975
10	Leu Glu Ser Leu Phe Val Ser Asn Lys Gly Ser Ile Leu Val Leu Leu		
	980	985	990
	Pro Arg Ile Leu Asp Leu Val Lys Leu Arg Val Leu Ser Val Gly Ala		
	995	1000	1005
	Cys Ser Phe Phe Asp Met Asp Ala Asp Glu Ser Ile Leu Ile Ala Lys		
15	1010	1015	1020
	Asp Thr Lys Leu Glu Asn Leu Arg Ile Leu Gly Glu Leu Leu Ile Ser		
	1025	1030	1035
	1040		
	Tyr Ser Lys Asp Thr Met Asn Ile Phe Lys Arg Phe Pro Asn Leu Gln		
	1045	1050	1055
20	Val Leu Gln Phe Glu Leu Lys Glu Ser Trp Asp Tyr Ser Thr Glu Gln		
	1060	1065	1070
	His Trp Phe Pro Lys Leu Asp Cys Leu Thr Glu Leu Glu Thr Leu Cys		
	1075	1080	1085
	Val Gly Phe Lys Ser Ser Asn Thr Asn His Cys Gly Ser Ser Val Ala		
25	1090	1095	1100
	Thr Asn Arg Pro Trp Asp Phe His Phe Pro Ser Asn Leu Lys Glu Leu		
	1105	1110	1115
	1120		
	Leu Leu Tyr Asp Phe Pro Leu Thr Ser Asp Ser Leu Ser Thr Ile Ala		
	1125	1130	1135
30	Arg Leu Pro Asn Leu Glu Asn Leu Ser Leu Tyr Asp Thr Ile Ile Gln		
	1140	1145	1150
	Gly Glu Glu Trp Asn Met Gly Glu Glu Asp Thr Phe Glu Asn Leu Lys		
	1155	1160	1165
	Phe Leu Asn Leu Arg Leu Leu Thr Leu Ser Lys Trp Glu Val Gly Glu		
35	1170	1175	1180
	Glu Ser Phe Pro Asn Leu Glu Lys Leu Lys Leu Gln Glu Cys Gly Lys		
	1185	1190	1195
	1200		
	Leu Glu Glu Ile Pro Pro Ser Phe Gly Asp Ile Tyr Ser Leu Lys Phe		
	1205	1210	1215

Ile Lys Ile Val Lys Ser Pro Gln Leu Glu Asp Ser Ala Leu Lys Ile  
 1220 1225 1230  
 Lys Lys Tyr Ala Glu Asp Met Arg Gly Gly Asn Glu Leu Gln Ile Leu  
 1235 1240 1245  
 5 Gly Gln Lys Asn Ile Pro Leu Phe Lys  
 1250 1255

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 1206 aminoácidos  
 (B) TIPO: aminoácido  
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 19:

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

# ES 2 356 630 T3

Lys Ala Ser Thr Ser Ala Glu Val Gly Arg Phe Ile Lys Lys Leu Leu  
 195            200            205  
 Glu Thr Ser Pro Asp Ile Leu Arg Glu Tyr Ile Ile Gln Leu Gln Glu  
 210            215            220  
 His Met Leu Thr Val Ile Pro Pro Ser Thr Leu Gly Ala Arg Asn Ile  
 5    225            230            235            240  
 His Val Met Met Glu Phe Leu Leu Leu Ile Leu Ser Asp Met Pro Lys  
 245            250            255  
 Asp Phe Ile His His Asp Lys Leu Phe Asp Leu Leu Ala His Val Gly  
 260            265            270  
 10    Thr Leu Thr Arg Glu Val Ser Thr Leu Val Arg Asp Leu Glu Glu Lys  
 275            280            285  
 Leu Arg Asn Lys Glu Gly Asn Asn Gln Thr Asn Cys Ala Thr Leu Asp  
 290            295            300  
 Leu Leu Glu Asn Ile Glu Leu Leu Lys Lys Asp Leu Lys His Val Tyr  
 15    305            310            315            320  
 Leu Lys Ala Pro Asn Ser Ser Gln Cys Cys Phe Pro Met Ser Asp Gly  
 325            330            335  
 Pro Leu Phe Met His Leu Leu His Met His Leu Asn Asp Leu Leu Asp  
 340            345            350  
 20    Ser Asn Ala Tyr Ser Ile Ser Leu Ile Lys Glu Glu Ile Glu Leu Val  
 355            360            365  
 Ser Gln Glu Leu Glu Phe Ile Arg Ser Phe Phe Gly Asp Ala Ala Glu  
 370            375            380  
 Gln Gly Leu Tyr Lys Asp Ile Trp Ala Arg Val Leu Asp Val Ala Tyr  
 25    385            390            395            400  
 Glu Ala Lys Asp Val Ile Asp Ser Ile Ile Val Arg Asp Asn Gly Leu  
 405            410            415  
 Leu His Leu Ile Phe Ser Leu Pro Ile Thr Ile Lys Lys Ile Lys Leu  
 420            425            430  
 30    Ile Lys Glu Glu Ile Ser Ala Leu Asp Glu Asn Ile Pro Lys Asp Arg  
 435            440            445  
 Gly Leu Ile Val Val Asn Ser Pro Lys Lys Pro Val Glu Arg Lys Ser  
 450            455            460  
 Leu Thr Thr Asp Lys Ile Ile Val Gly Phe Glu Glu Glu Thr Asn Leu  
 35    465            470            475            480  
 Ile Leu Arg Lys Leu Thr Ser Gly Pro Ala Asp Leu Asp Val Ile Ser  
 485            490            495

# ES 2 356 630 T3

	Ile Thr Gly Met Pro Gly Ser Gly Lys Thr Thr Leu Ala Tyr Lys Val		
	500	505	510
	Tyr Asn Asp Lys Ser Val Ser Arg His Phe Asp Leu Arg Ala Trp Cys		
	515	520	525
5	Thr Val Asp Gln Gly Tyr Asp Asp Lys Lys Leu Leu Asp Thr Ile Phe		
	530	535	540
	Ser Gln Val Ser Gly Ser Asp Ser Asn Leu Ser Glu Asn Ile Asp Val		
	545	550	555
	Ala Asp Lys Leu Arg Lys Gln Leu Phe Gly Lys Arg Tyr Leu Ile Val		
	565	570	575
10	Leu Asp Asp Val Trp Asp Thr Thr Thr Leu Asp Glu Leu Thr Arg Pro		
	580	585	590
	Phe Pro Glu Ala Lys Lys Gly Ser Arg Ile Ile Leu Thr Thr Arg Glu		
	595	600	605
	Lys Glu Val Ala Leu His Gly Lys Leu Asn Thr Asp Pro Leu Asp Leu		
15	610	615	620
	Arg Leu Leu Arg Pro Asp Glu Ser Trp Glu Leu Leu Glu Lys Arg Thr		
	625	630	635
	Phe Gly Asn Glu Ser Cys Pro Asp Glu Leu Leu Asp Val Gly Lys Glu		
	645	650	655
20	Ile Ala Glu Asn Cys Lys Gly Leu Pro Leu Val Ala Asp Leu Ile Ala		
	660	665	670
	Gly Val Ile Ala Gly Arg Glu Lys Lys Arg Ser Val Trp Leu Glu Val		
	675	680	685
	Gln Ser Ser Leu Ser Ser Phe Ile Leu Asn Ser Glu Val Glu Val Met		
25	690	695	700
	Lys Val Ile Glu Leu Ser Tyr Asp His Leu Pro His His Leu Lys Pro		
	705	710	715
	Cys Leu Leu His Phe Ala Ser Trp Pro Lys Asp Thr Pro Leu Thr Ile		
	725	730	735
30	Tyr Leu Leu Thr Val Tyr Leu Gly Ala Glu Gly Phe Val Glu Lys Thr		
	740	745	750
	Glu Met Lys Gly Ile Glu Glu Val Val Lys Ile Tyr Met Asp Asp Leu		
	755	760	765
	Ile Ser Ser Ser Leu Val Ile Cys Phe Asn Glu Ile Gly Asp Ile Leu		
35	770	775	780
	Asn Phe Gln Ile His Asp Leu Val His Asp Phe Cys Leu Ile Lys Ala		
	785	790	795
	800		

# ES 2 356 630 T3

	Arg Lys Glu Asn Leu Phe Asp Arg Ile Arg Ser Ser Ala Pro Ser Asp		
	805	810	815
	Leu Leu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Asp Tyr Asp Glu Glu Glu Glu His		
	820	825	830
5	Phe Gly Leu Asn Phe Val Met Phe Asp Ser Asn Lys Lys Arg His Ser		
	835	840	845
	Gly Lys His Leu Tyr Ser Leu Arg Ile Asn Gly Asp Gln Leu Asp Asp		
	850	855	860
	Ser Val Ser Asp Ala Phe His Leu Arg His Leu Arg Leu Ile Arg Val		
	865	870	875 880
10	Leu Asp Leu Glu Pro Ser Leu Ile Met Val Asn Asp Ser Leu Leu Asn		
	885	890	895
	Glu Ile Cys Met Leu Asn His Leu Arg Tyr Leu Arg Ile Arg Thr Gln		
	900	905	910
	Val Lys Tyr Leu Pro Phe Ser Phe Ser Asn Leu Trp Asn Leu Glu Ser		
15	915	920	925
	Leu Phe Val Ser Asn Lys Gly Ser Ile Leu Val Leu Leu Pro Arg Ile		
	930	935	940
	Leu Asp Leu Val Lys Leu Arg Val Leu Ser Val Gly Ala Cys Ser Phe		
	945	950	955 960
20	Phe Asp Met Asp Ala Asp Glu Ser Ile Leu Ile Ala Lys Asp Thr Lys		
	965	970	975
	Leu Glu Asn Leu Arg Ile Leu Gly Glu Leu Leu Ile Ser Tyr Ser Lys		
	980	985	990
	Asp Thr Met Asn Ile Phe Lys Arg Phe Pro Asn Leu Gln Val Leu Gln		
25	995	1000	1005
	Phe Glu Leu Lys Glu Ser Trp Asp Tyr Ser Thr Glu Gln His Trp Phe		
	1010	1015	1020
	Pro Lys Leu Asp Cys Leu Thr Glu Leu Glu Thr Leu Cys Val Gly Phe		
	1025	1030	1035 1040
30	Lys Ser Ser Asn Thr Asn His Cys Gly Ser Ser Val Ala Thr Asn Arg		
	1045	1050	1055
	Pro Trp Asp Phe His Phe Pro Ser Asn Leu Lys Glu Leu Leu Leu Tyr		
	1060	1065	1070
	Asp Phe Pro Leu Thr Ser Asp Ser Leu Ser Thr Ile Ala Arg Leu Pro		
35	1075	1080	1085

# ES 2 356 630 T3

Asn Leu Glu Asn Leu Ser Leu Tyr Asp Thr Ile Ile Gln Gly Glu Glu  
1090 1095 1100

Trp Asn Met Gly Glu Glu Asp Thr Phe Glu Asn Leu Lys Phe Leu Asn  
1105 1110 1115 1120

Leu Arg Leu Leu Thr Leu Ser Lys Trp Glu Val Gly Glu Glu Ser Phe  
5 1125 1130 1135

Pro Asn Leu Glu Lys Leu Lys Leu Gln Glu Cys Gly Lys Leu Glu Glu  
1140 1145 1150

Ile Pro Pro Ser Phe Gly Asp Ile Tyr Ser Leu Lys Phe Ile Lys Ile  
1155 1160 1165

10 Val Lys Ser Pro Gln Leu Glu Asp Ser Ala Leu Lys Ile Lys Lys Tyr  
1170 1175 1180

Ala Glu Asp Met Arg Gly Gly Asn Glu Leu Gln Ile Leu Gly Gln Lys  
1185 1190 1195 1200

Asn Ile Pro Leu Phe Lys  
15 1205

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un ácido nucleico aislado que tiene al menos un 50% de identidad con la secuencia de ADN de la Figura 5 y donde dicho ácido nucleico, cuando es transferido a una planta que es susceptible a una plaga vegetal, es capaz de reducir la susceptibilidad de dicha planta a dicha plaga vegetal.
- 5 2.- El ácido nucleico de la reivindicación 1 que es capaz, cuando es transferido a una planta huésped que es susceptible a una plaga vegetal, de convertir dicha planta huésped en resistente a dicha plaga vegetal.
- 3.- El ácido nucleico de la reivindicación 1 que, cuando es transferido a una planta huésped, es capaz de convertirla en resistente a insectos.
- 10 4.- Un ácido nucleico aislado que es capaz de, cuando es transferido a una planta que es susceptible a una plaga vegetal, reducir la susceptibilidad de dicha planta a dicha plaga vegetal, donde dicho ácido nucleico es un ADN homólogo que tiene al menos un 50% de identidad con una secuencia que comienza en la posición nucleotídica 3263 y termina en la posición nucleotídica 7111 de la secuencia de la Figura 5.
- 15 5.- Un ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, que tiene al menos un 50% de identidad con el inserto genómico presente en el plásmido pKGMi-11, estando depositado dicho plásmido pKGMi-11 en la Centraal Bureau Voor Schimmelkulturen en Baam, Países Bajos, bajo el Número de depósito CBS822.96.
- 20 6.- Una construcción de ADN recombinante que contiene un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 7.- Una construcción de ADN recombinante de la reivindicación 6 que contiene un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho ácido nucleico está bajo el control de un promotor que es funcional en una célula vegetal, siendo dicho promotor endógeno o exógeno para dicha célula vegetal, y eficaz para controlar la transcripción de dicha secuencia de ADN en tales células vegetales.
- 25 8.- Una construcción de ADN recombinante de la reivindicación 7, en la cual dicho promotor es una secuencia promotora situada 5' corriente arriba del nucleótido 3263 según se proporciona en la Figura 5, o cualquier secuencia de ADN homóloga que tenga al menos un 50% de identidad con dicha secuencia promotora y contenga las secuencias reguladoras requeridas para la transcripción de la secuencia codificadora adyacente.
- 30 9.- Un vector adecuado para transformar células vegetales, conteniendo dicho vector una construcción de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
- 10.- Células bacterianas que contienen un vector de acuerdo con la reivindicación 9.
- 11.- Células vegetales que contienen una construcción de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
- 35 12.- Una planta que contiene células vegetales de acuerdo con la reivindicación 11.
- 13.- Una planta de acuerdo con la reivindicación 12 que tiene una susceptibilidad a insectos reducida.
- 14.- Una semilla que contiene una construcción de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
- 40 15.- Un proceso para obtener plantas con susceptibilidad reducida a una plaga vegetal, que comprende las etapas siguientes:
- i) la inserción en el genoma de una célula vegetal de una construcción de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8,
  - ii) la obtención de células vegetales transformadas,
  - iii) la regeneración de plantas transformadas genéticamente a partir de dichas células vegetales transformadas, y
  - iv) opcionalmente, la propagación de dichas plantas.
- 16.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicha plaga vegetal es un insecto.
- 45 17.- Un proceso para proteger las plantas en cultivo frente a una infección por una plaga vegetal, que comprende:
- i) la inserción en el genoma de una célula vegetal de una construcción de ADN de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 8,
  - ii) la obtención de plantas transformadas, y
  - iii) el cultivo de dichas plantas transformadas.

18.- Un polipéptido que es el producto de expresión de un ácido nucleico o de un ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y que tiene al menos un 50% de identidad con la secuencia de proteínas de la Figura 7A.

5 19.- Un ARN aislado que tiene una secuencia de ácido ribonucleico de un transcrito de la secuencia de ADN de la reivindicación 1 ó 2.



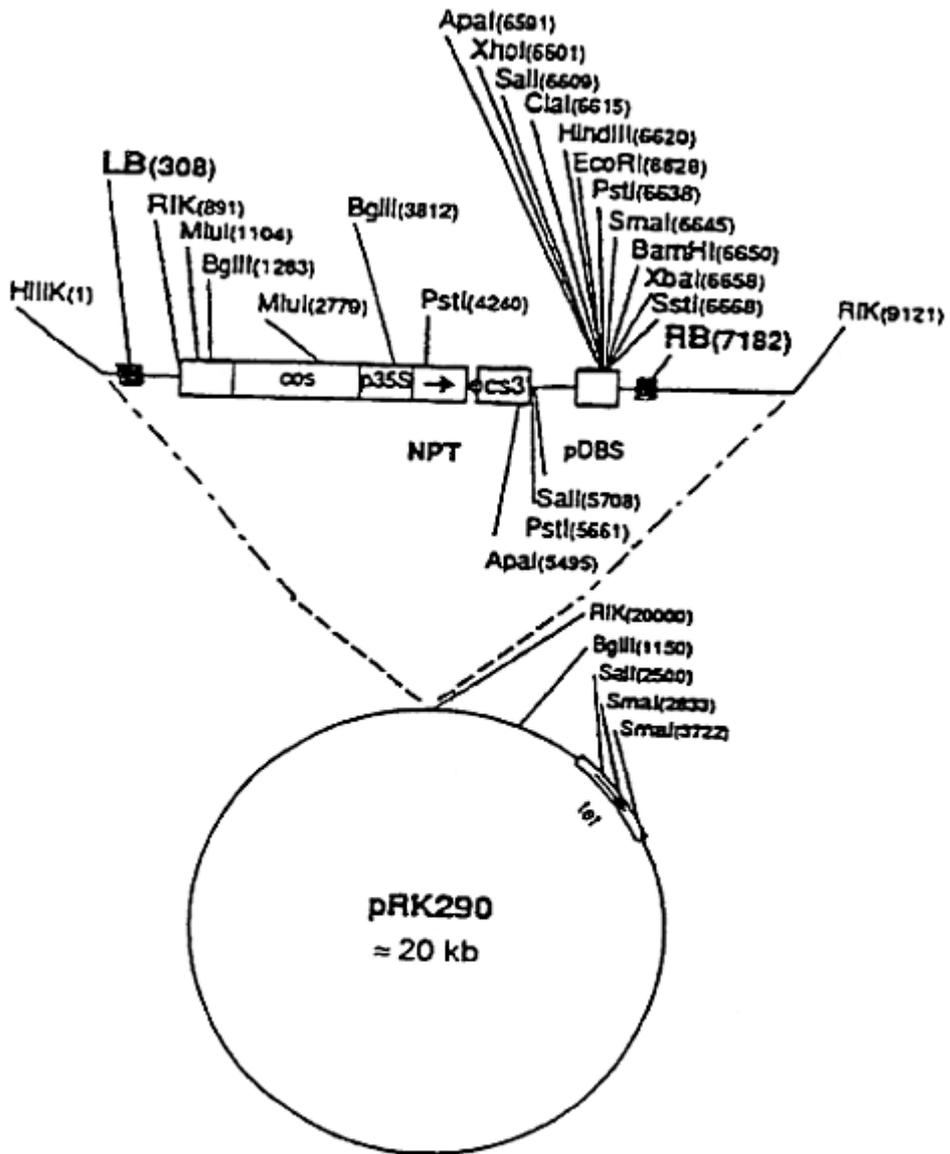
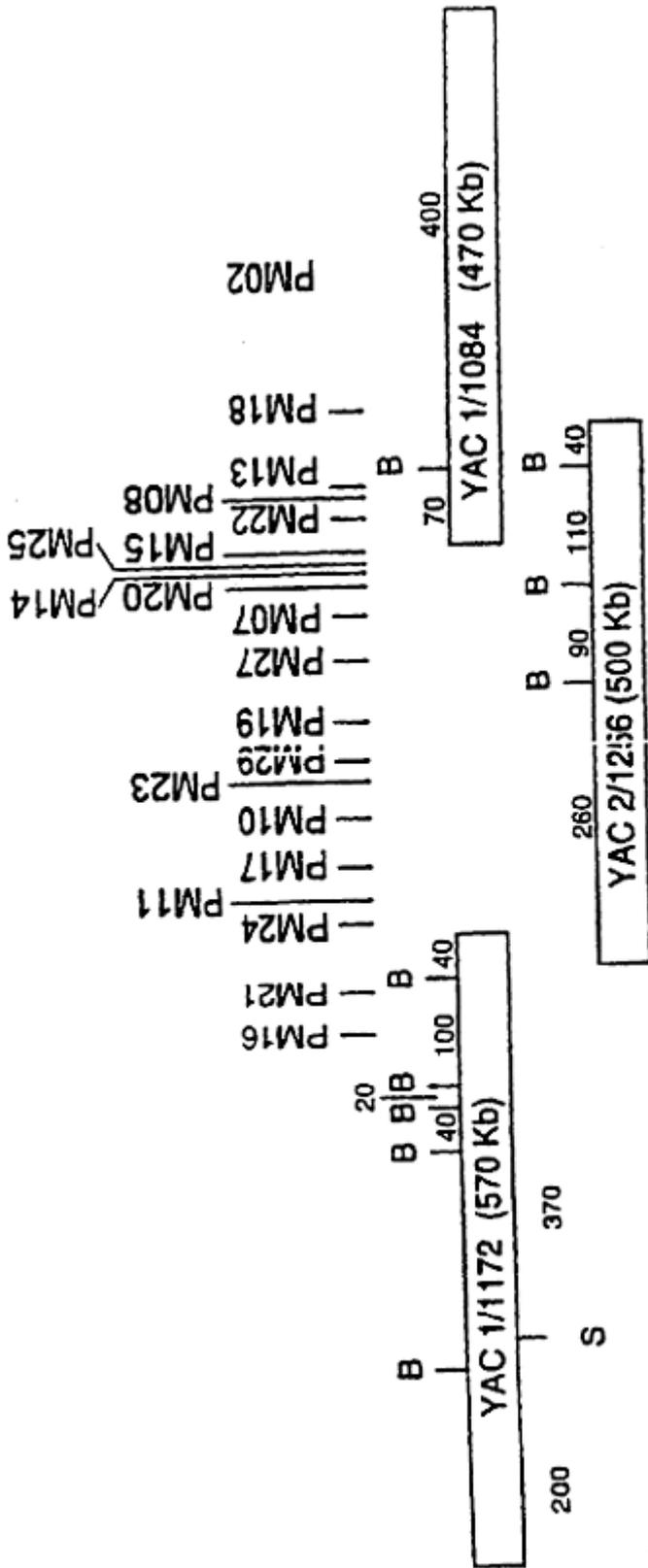


FIGURA 2



100 Kb  
 B = BssHII  
 S = SfiI

FIGURA 3A

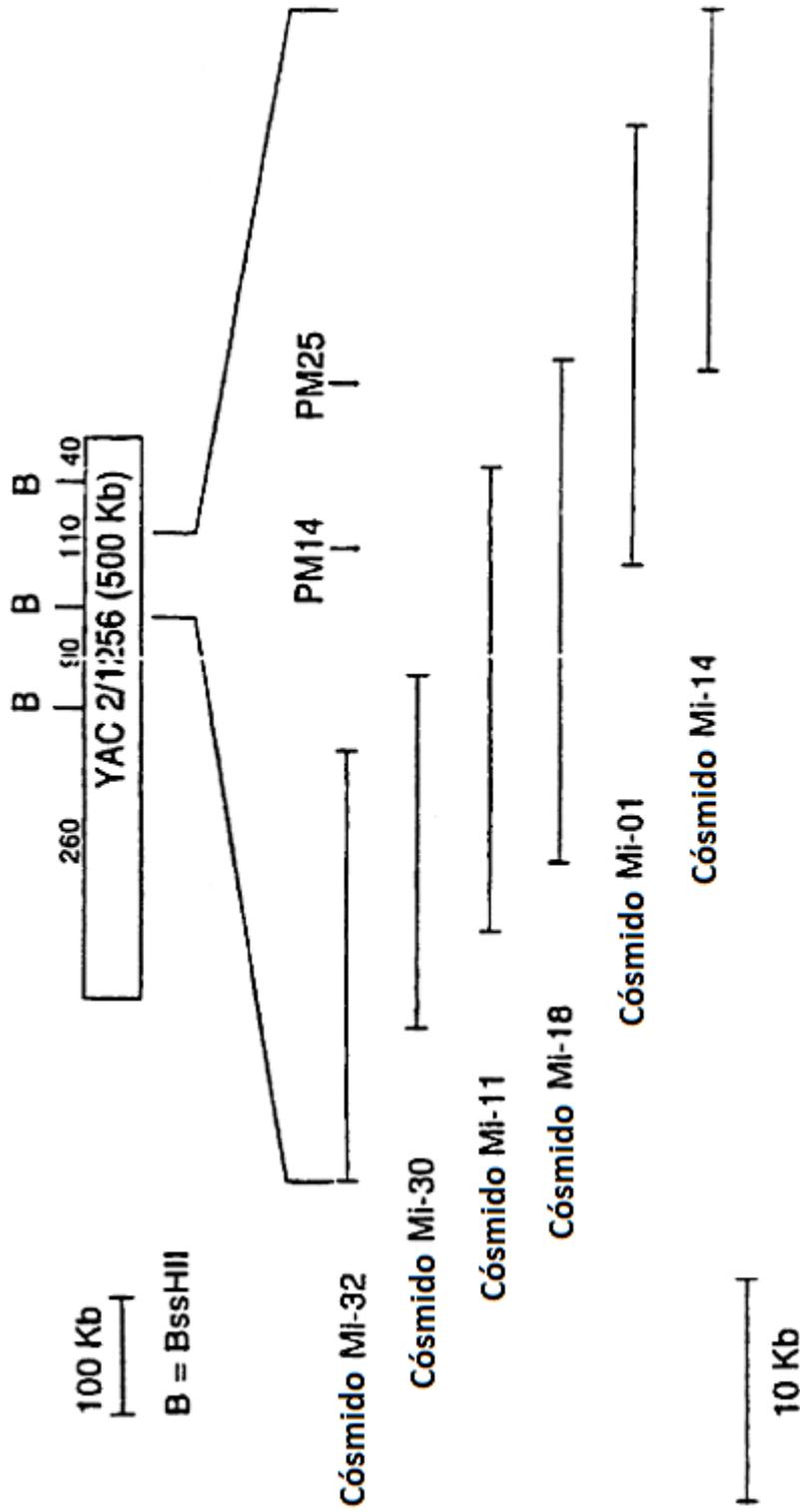


FIGURA 3B

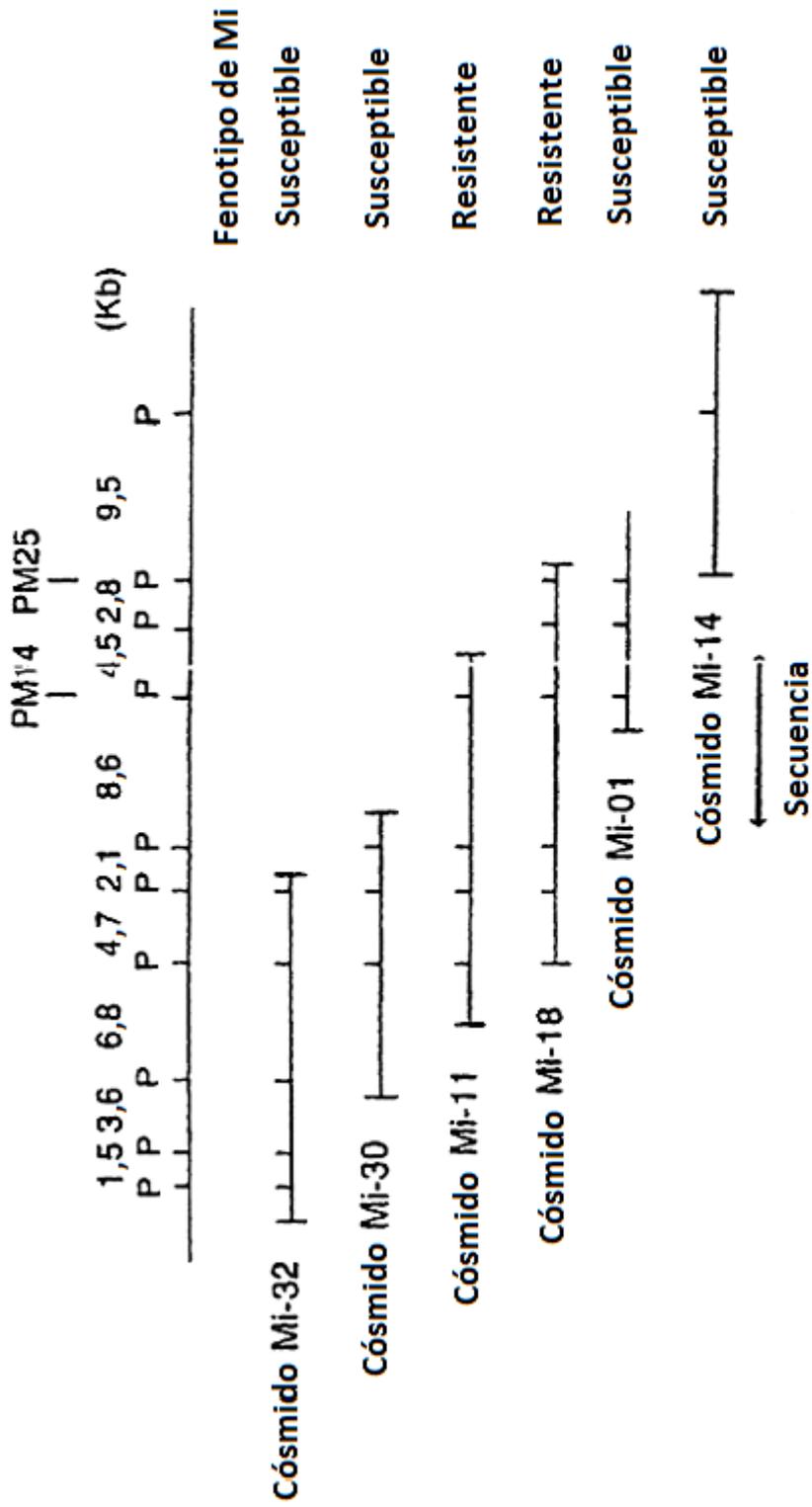


FIGURA 4

5' - TTTTCCTCTTCATATAACTTTTTCTTAACCCCTCTCATGAATAATATAATTGATGTGGA 60  
TAAAGTATTATCCTTTATGATAAAATAACGAAAATTAAATAA'TTAAAGGGTGCAAACTCAT 120  
AAAAATGGAGACGCACATTTGATAAATGTCCCTTTGATTAATTAATAAAGAATTACTCTAGCTT 180  
CACAAATTTAAATTCATTAATGCTTAATTACATGATAAAAACTTTAGTTGTTCTTTTAC 240  
ATGGTTTGCCTAACTTTAATTTTTTTCTTCATATCTTCATTTGTTTATTATATATTTCT 300  
AATTACTTATTAACTTTTATACTCTTAATAATTCATAAECTCTCATCTTTTCAATATTCATA 360  
ACCTCCAAATATTTAACTAAAAC'TTAAGATATCTTTTGATATTTGTTCAATAATAAAT 420  
TCAACTTCTTTATCTTATGAAACCCCTACCAAGATTATTAGGCTATTATTTTTATTCTA 480  
TAGTAAAAACAATGATGAAGATTCTTGAATTTATAGGATATGAAAGAAGTCGATAAAA 540  
TCTCAGAGAGTTATGFACTAATTTTGTACTTATTTTTTCATCTATATATACATAAACTCTT 600  
ATAAGAATAATGCTCATATTTGATTTTTTTCTTAAATAATATGTTTCTTTTTAATTTTTT 660  
TTCACCTGTAGACTCTTAATTTAGTTTTCTATGAATGTTTTATTGCCGTAAGCTTT 720  
GAATTTTGTAAATGTTACATTTTATTATTCATTCAGATTTACATATATATTTCCATGAGA 780  
TTTGGTCAATTCACGTATCTATAAAAA'TTCACATGAAACACACGTTGTAAGCCGATCCT 840  
CAGAAAAACTAGTGATA 900  
TA 960  
TTTTAATCTGGTTAAAAAAGAATAATCTCTTTCTTTTTTGACAAATTTTAACTTTAAC 1020  
TTTCCACGTAACATGTTTAAAGACAACAAAATTTAAATGACATTTTAACTTTGTAACATAGA 1080  
AAAGTAACATATGATAAATGTCGTTGTCCTTAAACATGATAGATGTATAAATTCAAAAGTC 1140  
AATGAATGTATTTTAGTATTATATGAATGAACAAACTGTCAGATGTGTATATATA 1200  
TATATAATTTATTTCTTGTAAATTTGGCCTTTCAAGTAATTAATTCATTTGTTAGGCAGTTG 1260  
AATTAATAATCTCTTTTAGGAATCTTCCCATGTGAATAACAAGACTTATAATAATAATAA 1320  
TAAAGTCCAGATCTTGTTCATTTGGATCATTTGGCAACAATTACTCTGTTTCTGAAAC 1380  
AAGGAATAGGGCTTCAATATTTGAGGGGATTTTTTTTTCTTCATTAATTTATACTTATG 1440  
ATATTAATTAATGTTTTGAGTACATATTTTAAACTCTGTTGTTTATTTTTCTGCAAAGT 1500  
TTCTCCGGTTATATTGAACATATACACATATAGTACATATATTTATTTGTAAAAAAATAA 1560  
TTATTATACTCCATTTCAAGAAA'TTATGTTTTGATATTATATATAAATCTATAAATGTG 1620  
GAAATGTCAATGTCTACAATGTGTTTGTATGAAATGACAACCAC'TTGTTTTTATCTGCAA 1680  
CAGTATAAAAA'TTGGCTTTGCTCTTTTAGATTAATATAAATTTTACAGGTCACATATT 1740  
ATATTTATATTTGTGAAAGACAAGAGATATTGATTAAAAAAAGACTTATGGGTTTGTATTT 1800  
TAATATTTCAATCTCTTCTTCAATTAACAAAAGACTTGTATCGTATATTTCAACTACTACACT 1860  
TGTTTTCTTATCCAATAGCTTCAACATTTATTTCTCAACAAAAGGGTCTCTAGCTAAACT 1920  
TCAGCCTGTGTAAAGGTAACATCTTCTTTATTACAGCATAATAACAATGAATTTGGTCTG 1980  
ATGTTTGAAGTAAGCTTGAATTTTCTCTTTCTTAAGTTTGTGTTGATCCATTTAGATTCTT 2040  
TTAAATAC'TTTGGTATTTAAAGGACTTGTGAAGTCAATGAATTTGATTTTAGTAATCTT 2100  
GCAATTCAGATCTAGCTATTTGTTGTTCTCTTTTCAACCAAAC'TACTTCTTCAATTTGT 2160  
CTAACAAAAATATGTCAAAAAGGTATGAACATGCTTAA'TCGGAGATCTTTATTGATTCTA 2220  
CTTCAGCTACTCTAAAAAATAATCTTTTTTCCATTAAGCCCAAGTCGAGATAGGAGAAAA 2280  
ATATTATTAGAGAGATTATTAATTTAATGACATTTTACTCTAGTTTTTTATCAAAA'TAAG 2340  
GGAATAATATCTTGTATTTAACTACC'TTTAAGCATTATGGGTGGAAAGTAGAAAGAAG 2400  
AAACATAACAGAACAGACAGTAAGTTATGCTTTAATGAGTAGATCTGTATAGGATTACAT 2460  
ATTTGTTGACTTTTCCGGTGTTCGATTAGAAAACTTACAAGTTTTTAAATACATGTATCA 2520  
TTTTGTTGATTTGTCCGTTTGGCACGTCACTGTGGTTACAAGTCACATATGAAGTATGTC 2580  
CACGAGACACACCGAATGTCAAGTATAGATTTCTACTTGATCATACACAAC'TTTATCTGA 2640  
GGTTGATGCCAAATTTAAATGACTACCTAAAGCTGATATTTTAAACATTAATCTTTGTACA 2700  
CGAAAACATTAATCTTACTGTTTCTTTTACC'TTAAAGACTTTTTTGGCAGA 2760  
AAAAAGTTAGACAGATACATTTGATGATGTTTACCATTCTCATTTCTCTTTATTTTATT 2820  
TTCTTTTACATTCACACGCACAATAATTTTCTTGTAGGTTCC'TTATATGCCATATGCACAT 2880  
AGACGAA'TCTAGCATTTGATATTTACAACTTTCTATGTCGACGTCATATTAATATCAATA 2940  
ATAATTAAGATTGACAAATCACATATTTATAATAATTAAGTCGATAAATTTCTTTCTTTGATA 3000  
GCTTTGCAAAAGTAATGGTAAACGAGCAGGACTCTTTTCTTTTTTTTTGTAATAAATTA 3060  
CAGTTTGTAGATTTTATGTTTGTGACTTTCATGTCATAAACA'TTTTGAATGTGATTAAGA 3120

FIGURA 5A

TTGACATTTCCAATTGTGCGAGTCTAAAATTACTATATGTGAAAATAGTGATAT'TATTTGA 3180  
 TTATTCGTATTTTTTCATCTTCTTTCTCCTGTTAAAGTTTTATCTACT'TTTTATTCATCA 3240  
 GGTCTTGAGAAAAAGTAGAATCATGGA AAAACGAAAAGATATGAAGAAGCAAACAATC 3300  
 M E K R K D I E E A N N S 13  
 ATTGGTATGTTATTTTATAGAGTAAACTGTAAAGTATTGAATTATAGATATGTGGCTTTA 3360  
 L 14  
 AAATGTATTATTTTGGCAGGTGTTAT'TTCTGCTCTTAGCAAGGACAT'TGCCAATGTTCT 3420  
 V L F S A L S K D I A N V L 28  
 AATTTTCCCTAGAGAATGAGGAAAATCAAAAAGCTCTTGACAAAGATCAAGTTGAAAAGCT 3480  
 I F L E N E E N Q K A L D K D Q V E K L 48  
 AAAATTGAAAATGGCATT'TATTTGTACATATG'TTCAGC'TTCTTAT'TCCGATTTTGAGCA 3540  
 K L K M A F I C T Y V Q L S Y S D F E Q 68  
 GTTTGAAGATATAATGACTAGAAAATAGACAAGAGGTTGAGAAATCTGCTTCAATCACTTTT 3600  
 F E D I M T R N R Q E V E N L L Q S L L 88  
 GGATGATGATGTCCTTACTAGCCTCACCAGTAATGGATGACTGTATCAGCTTGTATCA 3660  
 D D D V L T S L T S N M D D C I S L Y H 108  
 TCGTTCTTATAAATCAGATGCCATCATGATGGATGAGCAATTGGACTTCTCTCTCTTGAA 3720  
 R S Y K S D A I M M D E Q L D F L L L N 128  
 TCTGTATCATCTATCCAAGCATCAGCCTGAAAAGATAT'TCCTGGAGTGACTCAATATGA 3780  
 L Y H L S K H H A E K I F P G V T Q Y E 148  
 AGTTCTTCAGAATGTATGTGGCAACATAAGAGAT'TCCATGGGTGATACTGAATGGTTG 3840  
 V L Q N V C G N I R D F H G L I L N G C 168  
 CATTAAGCATGAGATGGTTGAGAATGTC'TTACCTCTGTTTCAACTCATGGCTGAAAAGAT 3900  
 I K H E M V E N V L P L F Q L M A E R V 188  
 AGGACACTTCTTTGGGAGGATCAGACTGATGAAGACTCTCGCTCTCCGAGCTAGATGA 3960  
 G H F L W E D Q T D E D S R L S E L D E 208  
 GGATGAACACAATGATAGAGACTCTCGACTCTTCCAGCTAACACATCTACTCTTGAAGAT 4020  
 D E H N D R L F Q L T H L L L K I 228  
 TGTTCCAACTGAACTGGAGGTTATGCACATATGTTATACAAAAT'TGAAAAGCTTCAACTTC 4080  
 V P T E L E V M H I C Y T N L K A S T S 248  
 AGCAGAAGTTGGACGCTTCATTAAGAAGCTCC'TGGAAACCTCACCGGATAT'TCTCAGAGA 4140  
 A E V G R F I K K L L E T S P D I L R E 268  
 ATATATCATTCAACTACAAGAGCATATGTTAACTGTTAT'TCCCCCTAGCACTTTAGGGGC 4200  
 Y I I Q L Q E H M L T V I P P S T L G A 288  
 TCGAAACATTCATGTATGGAATTCCTATTACTTATCTTTCTGATATGCCCAAGGA 4260  
 R N I H V M M E F L L L I L S D M P K D 308  
 CTTTATTCATCATGACAACTTTTGTATCTCTTGGCTCATGTTGGAACACTTACCAGGGA 4320  
 F I H H D K L F D L L A H V G T L T R E 328  
 GGTATCGACTCTTGTACGTGACTTGGAAAGAAAATTAAGGAATAAAGAGGGTAATAACCA 4380  
 V S T L V R D L E E K L R N K E G N N Q 348  
 AACAAATTGTGCAACCCCTAGACTTGC'TGGAAAATATTGAACTCCTCAAGAAAAGATCTCAA 4440  
 T N C A T L D L L E N I E L L K K D L K 368  
 ACATGTTTATCTGAAAGCCCCAAATTCATCTCAATGTTGCTTCCCCATGAGTGATGGACC 4500  
 H V Y L K A P N S S Q C C F P M S D G P 388  
 ACTCTTCATGCATCTTCTACACATGCACCTAAAATGATTGCTAGAT'TCTAATGCTTATTC 4560  
 L F M H L L H M H L N D L L D S N A Y S 408  
 AATTTCTTTGATAAAGGAAGAAATCGAGTTGGTGAGTCAAGAAC'TGGAATTCATAAGATC 4620  
 I S L I K E E I E L V S Q E L E F I R S 428  
 AT'TCTTTGGGGATGCTGCTGAGCAAGGATTGTATAAAGATATCTGGGCACGTGTTCTAGA 4680  
 F F G D A A E Q G L Y K D I W A R V L D 448  
 TGTGGCTTATGAGGCAAAAGATGTATAGATTCAATTA'TGTTTCGAGATAATGGTCTCTT 4740  
 V A Y E A K D V I D S I I V R D N G L L 468  
 ACATCTTATTTTCTCACTTCCCA'TTACCATAAAGAAGATCAAAC'TTATCAAAGAAGAGAT 4800  
 H L I F S L P I T I K K I K L I K E E I 488

FIGURA 5B

CTCTGCTTTAGATGAGAACAATTCCCAAGGACAGAGGTCCTAATCGTTGTGAACTCTCCCAA 4860  
 S A L D E N I P K D R G L I V V N S P K 508  
 GAAACCAGTTGAGAGAAAGTCATTGACAACCTGATAAAAATAATTGTAGGTTTTGAGGAGGA 4920  
 K P V E R K S L T T D K I I V G F E E E 528  
 GACAAACTTGATACTTAGAAAGCTCACCAGTGGACCCGCAGATTTAGATGTCATTTTCGAT 4980  
 T N L I L R K L T S G P A D L D V I S I 548  
 CACCGGTATGCCGGGTTTCAGGTAAAACCTACTTTGGCATACAAAGTATACAATGATAAGTC 5040  
 T G M P G S G K T T L A Y K V Y N D K S 568  
 AGTTTCTAGACATTTTGACCTTCGTGCATGGTGCACGGTCGATCAAGGATATGACGACAA 5100  
 V S R H F D L R A W C T V D Q G Y D D K 588  
 GAAGTTGTTGGATAACAATTTTCAGTCAAGTTAGTGGCTCAGATTCAAATTTGAGTGAGAA 5160  
 K L L D T I F S Q V S G S D S N L S E N 608  
 TATTGATGTTGCTGATAAATGCGGAAACAACCTGTTTGGAAAGAGGTATCTTATTGTCTTT 5220  
 I D V A D K L R K Q L F G K R Y L I V L 628  
 AGATGATGTGTGGGATACTACTACATTTGGATGAGTTGACAAGACCTTTTCCTGAAGCTAA 5280  
 D D V W D T T T L D E L T R P F P E A K 648  
 GAAAGGAAGTAGGATTAATTTGACAACCTCGAGAAAAGGAAGTGGCTTTGCATGGAAAGCT 5340  
 K G S R I I L T T R E K E V A L H G K L 668  
 GAACACTGATCCTCTTGACCTTCGATTGCTAAGACCAGATGAAAGTTGGGAACTTTTAGA 5400  
 N T D P L D L R L L R P D E S W E L L E 688  
 GAAAAGACATTTGGTAATGAGAGTTGCCCTGATGAACCTATTAGATGTCGGTAAAGAAAT 5460  
 K R T F G N E S C P D E L L D V G K E I 708  
 AGCCGAAAATTGTAAGGGCTTCCTTTGGTGGCTGATCTGATTGCTGGAGTCATGCTGG 5520  
 A E N C K G L P L V A D L I A G V I A G 728  
 GAGGGAAAAGAAAAGGAGTGTGTGGCTTGAAGTTCAAAGTAGTTGAGTCTTTTATTTT 5580  
 R E K R S V W L E V Q S S L S S F I L 748  
 GAACAGTGAAGTGAAGTGATGAAAGTTATAGAATTAAGTTATGACCATTTACCACATCA 5640  
 N S E V E V M K V I E L S Y D H L P H H 768  
 CCTCAAGCCATGCTTGCTTCACCTTGCAAGTTGGCCGAAGGACACTCCTTTGACAATCTA 5700  
 L L K P C L L L H F A S W P K D T P L T I Y 788  
 TTTGTTGACTGTTTATTGTTGGTGTGAAGGATTTGTGGAAAAGACGGAGATGAAGGGTAT 5760  
 L L T V Y L G A E G F V E K T E M K G I 808  
 AGAAGAAGTGGTGAAGATTTATATGGATGATTTAATTTCCAGTAGCTTGGTAATTTGTTT 5820  
 E E V V K I Y M D D L I S S S L V I C F 828  
 CAATGAGATAGGTGATATACTGAATTTCCAAATTCATGATCTTGTGCATGACTTTTGTTT 5880  
 N E I G D I L N F Q I H D L V H D F C L 848  
 GATAAAAGCAAGAAAGGAAAATTTGTTTGATCGGATAAGATCAAGTGCCTCCATCAGATTT 5940  
 I K A R K E N L F D R I R S S A P S D L 868  
 GTTGCCCTCGTCAAATACCATTGATTATGATGAGGAGGAGGAGCACTTTGGGCTTAATTT 6000  
 L P R Q I T I D Y D E E E E H F G L N F 888  
 TGTCATGTTTCGATTCAAATAAGAAAAGGCATTTGGTAAACACCTCTATTCTTTGAGGAT 6060  
 V M F D S N K K R H S G K H L Y S L R I 908  
 AAATGGAGACCAGCTGGATGACAGTGTCTGATGCATTTACCTAAGACACTTGAGGCT 6120  
 N G D Q L D D S V S D A F H L R H L R L 928  
 TATTAGAGTGTGGACCTGGAACCCCTCTTTAATCATGGTGAATGATCTTTGCTGAATGA 6180  
 I R V L D L E P S L I M V N D S L L N E 948  
 AATATGCATGTTGAATCATTTGAGGTACTTAAGAATTCGGACACAAGTTAAATATCTGCC 6240  
 I C M L N H L R Y L R I R T Q V K Y L P 968  
 TTTCTCTTTCTCAAACCTCTGGAATCTAGAAAGTCTGTTTGTGTCTAACAAAGGATCAAT 6300  
 F S F S N L W N L E S L F V S N K G S I 988  
 CTTGGTACTATTACCGAGAATTTGGATCTTGTAAGTTGCGAGTGCCTGTCCGTGGGTGC 6360  
 L V L L P R I L D L V K L R V L S V G A 1008

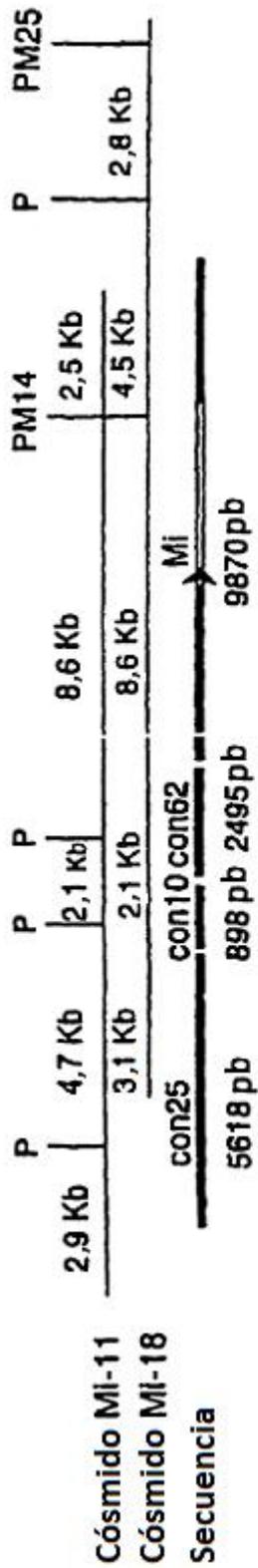
FIGURA 5C

TTGTTCCTTTCTTTGATATGGATGCAGATGAATCAATATTGATAGCAAAGGACACAAAGTT 6420  
 C S F F D M D A D E S I L I A K D T K L 1028  
 AGAGAACTTGAGAATATTAGGGGAAGTGTGATTTCCCTATTCGAAAGATACAATGAATAT 6480  
 E N L R I L G E L L I S Y S K D T M N I 1048  
 TTTCAAAGGTTTCCCAATCTTCAGGTGCTTCAGTTTGAAGTCAAGGAGTCATGGGATTA 6540  
 F K R F P N L Q V L Q F E L K E S W D Y 1068  
 TTCAACAGAGCAACATTTGGTTCCCGAAATTTGGATTGCCTAACTGAAGTGAAGAACTCTG 6600  
 S T E Q H W F P K L D C L T E L E T L C 1088  
 TGTAGGTTTTAAAGTTCAAACACAAACCCTGTGGGTCCCTGTGTGCGACAAATCGGCC 6660  
 V G F K S S N T N H C G S S V A T N R P 1108  
 GTGGGATTTTCACTTCCCTCAAATTTGAAAGAAGTGTGTGTATGACTTTCCTCTGAC 6720  
 W D F H F P S N L K E L L Y D F P L T 1128  
 ATCCGATTCACATCAACAAATAGCGAGACTGCCCAACCTTGAAAAATTTGTCCCTTTATGA 6780  
 S D S L S T I A R L P N L E N L S L Y D 1148  
 TACAATCATCCAGGGAGAAGAAATGGAACATGGGGGAGGAAGACACTTTTGAGAATCTCAA 6840  
 T I I Q G E E W N M G E E D T F E N L K 1168  
 ATTTTGAAGTTCGCTACTGACTCTTCCAAAGTGGGAGGTTGGAGAGGAATCCTTCCC 6900  
 F L N L R L L T L S K W E V G E E S F P 1188  
 CAATCTTGAGAAATTTAAACTGCAGGAATGTGGTAAGCTTGAGGAGATTCCACCTAGTTT 6960  
 N L E K L K L Q E C G K L E E I P P S F 1208  
 TGGGATATTTATTCATTTGAAATTTATCAAAATTTGTAAGAGTCTCAACTTGAAGATTC 7020  
 G D I Y S L K F I K I V K S P Q L E D S 1228  
 TGCTCTCAAGATTAAGAAATACGCTGAAGATATGAGAGGAGGGAACGAGCTTCAGATCCT 7080  
 A L K I K K Y A E D M R G G N E L Q I L 1248  
 TGGCCAGAAGAATATCCCTTATTTAAGTAGCATTTTGGTTGAAGTTCCTTGGTGATAT 7140  
 G Q K N I P L F K --- 1257  
 TGTATATGATTTAAATATCCTGTGATGAGATTCCCTTTAGTTTCTTTTAAACAAAAATAT 7200  
 AATTTTTATAAGTACACATATCGTTTGTAAATTTGTCCATTTGTGATTGCAAGTCACACA 7260  
 TGAGGTATGTTTCGTATTATGGGTTTCAACTTGATCAGACGTAATTTTAAAGATAAGTGCTT 7320  
 ATATGATGTTGCATGCCAGATGGAAGTACTATGTGAAGTTTATATTTTAAACATTAATC 7380  
 TTGTATACCAAACACTACTATTCCTATGCTATGTTGTTGGCATGTCGTCTCTCTCTTTATT 7440  
 TTTTTTCTTTCCATTCACACACACATTAATTTTCTAGTAGACCGCATATTACTACATCTG 7500  
 TATTTGTCCGTATACAAGACGAATCCAGGATTTGATGTTTACAAGTATTTGTGAAGAATCC 7560  
 AGGATTTGATGTTTACAAGACAATTAGATTATATATGATAGGATTTTGACAGAAACTG 7620  
 AGGGATTCACATGACAATTACTCTGTGGATTTGCCTTTGGCTGTCCAAACCTCCTTTGTG 7680  
 TCTAACTTCGTCTGAAGTCCCAATTTATATGCTCAAAGCTCAGTCAAGGTAAGTATTCAA 7740  
 AGCTAGGCTGTGAAGTAAACTTTAAATGATATTGCTGCAAAGTCTGCTCAACAAAGGGTC 7800  
 ATAACCATCACTACAACACTACAAGCTCAAGCAAGTAAACGCGGGTGAAAGATTAACATA 7860  
 GATCGCTATCCCCGCAAAAGCTAAGGAAAGCATCTCTAACTTCTTAGCATGTACTCAA 7920  
 CACACGATCTGTAAGGATGCCAGAAAGAGAAAGTTACGTTGCCGCAATTCCTTACAGTGT 7980  
 TGCACAATGTCCCCAAAACCAACATCACACTACAAAAAAGGCTCAAATTTCTGGGGGTTA 8040  
 TAATTAGACGGTCAATAACCCCTGCAATTTAGTGTGTGGAGGTTGAATAAACTCCTCCA 8100  
 ATTAGGAGTGTCACAATTAAGTCGCGTGGGATTTCTTGGCACA'TCCCGGTAAGGTTAACTA 8160  
 GC'GGGGGTTTTGAACCCCAACCGCATTTCAAAGTGGAGTGGAAACCCCAACGATTTGTG 8220  
 AACTCGGGGGAGTCAAAAACCCCGCAATAAATGATTTTACATTTAAAATTAATAGGAGC 8280  
 TTGGACCCCTGTGATTTATGAAATATAACTTTTTGTAGCATTTGCCAGAAATATTCAATT 8340  
 TTAGATACTAATAATAAATTAATTAACATAACATGTGCATCATATTCAAAGGACATATTA 8400  
 GTATTAAGAAATAATAACAATTAACAACAAAAGTACCCAACTCAAGATAGGATCAGTT 8460  
 TATGGAACCTTCAACTAGTTTCACTATAATTTATTGCTACTAACATCAGCTGGCTGCAAAGG 8520  
 AGAATACATAATAAGTACTTATCCAAACTCAAAATCATGGCTGAATGTAGTAAAACAC 8580  
 CAAAGATTTATAATAATTTCCA'TTAATTATCATATACACACAACAACAACTTAAAACAA 8640  
 TATAGAAAAGGATTAACCATTTACACAAGCAATGATTCATACCATTTCAAACGACAA 8700  
 CATACTGTACTACTAAACAAGACACCATCAAAGTATTGGACAAATA'TAACAATAGTT 8760

FIGURA 5D

AAAACATGAACAAAGAATCTCAGGTTTCCTGTCAGTAGAAAAGAGACAGACTAGGAACTG 8820  
 GAGTGCATATTTTCTTATAAGAGACAATTAATGTTTACTTCTTTATATTTTGACTATAAG 8880  
 TTGATTGGTTATAATGTTTACGAGGTTGTATATAATCCGATGTTCAATGATATGACTTTC 8940  
 CTATTGACTGAAATGCTTGAACGCAAAACAGTATATCTAGATTAAGAATGAGGACGAATTA 9000  
 CCTCTAGAGGCATGGGTAATGGAAGCATAACTCCTTGATAATGGTTGTTAGCCCCTGCA 9060  
 AGTCACAAAACAAAACATCCGTAATATTAACATACTAAGGTTGTAAGCACTAAACGACAA 9120  
 CAACTATGCCCAATCCCACTAAGTTGGAATCGACTATATGAATACTCACAATTCGAT 9180  
 TTATAGACAAAGATACTAGTAGAAATGACGTCCTTCTTTCTATGTTAACACTTGGACAG 9240  
 AGAATGTTAAAGACTTACAACAACAGAAAAGAGTTAAAATCATTTAATTGAGCAAGGATT 9300  
 TCAAAACGACAACACAATATACTCAATTTTCGACGGAAAACAACCTGGTTGGACAACAGTG 9360  
 CTATTTGTAACCTCCAATGAACAACACTGCAACGTACATGTATCTCATTGCACTAAATAAA 9420  
 TCCCGTTGAGAGTAACATATCAATAGTTACGAACAATATGATCACGACAAAAGGATTGTAA 9480  
 GTACCACAGGACAAGTCATGCTTGCAATGAAAAACGGATATGTAAGAACCAAAATCCTGC 9540  
 TGCTGAAATAAGCAGTTATGATTATCCAAAAATCATGAATACACATGCACCTTGAGTTTGT 9600  
 TCCAAGAAAAACACAACCAACTACTGTGCAAGTGAAGATTCAAAAAGTGACTATTGATGT 9660  
 TAATTCCTCCACAAGGTTGAATAATTTTGTCACTATAGGATTTAAGACGAAGAAGAAACA 9720  
 GCGCAATTTTGTAAAGCATAGACCTTCTTATGCAACTATGAGCTGGTATGCTATTCATT 9780  
 TTCTTTACTCGTAAAAATCGTTGATACTAAAGAATGCCAATCCAGTCCCTGCTGAATAGGC 9840  
 GCCAGGTGACTGGTTGCTGTTAATAATTTT- 3' 9870

FIGURA 5E



YAC	MI-11 E. coli	MI-11 A. tum	MI-18 E. coli	MI-18 A. tum	E22	52201	MI-11 Plantas-RO	MI-18 Plantas-RO
+	+	+	+	+	+	-	+	-
+	+	+	+	+	+	-	+	-
+	+	+	+	+	+	-	+	-
+	+	+	+	+	+	-	+	-
+	+	+	+	+	+	-	+	-
+	+	+	+	+	+	-	+	-
+	+	+	+	+	+	-	+	+

FIGURA 6

MEKRKDIEEA NNSLVLFSA SKDIANVLIF LENEENQKAL DKDQVEKLKL KMAFICTYVQ  
 LSYSDFEQFE DIMTRNRQEV ENLLQSLDD DVLTSLTSNM DDCISLYHRS YKSDAIMMDE  
 QLDLFLNLY HLSKHHAEKI FPGVTQYEV QNVCGNIRDF HGLILNGCIK HEMVENVLP  
 FQLMAERVGH FLWEDQTDSD SRLSELEDE HNDRDSRLFQ LTHLLKIVP TELEVMHICY  
 TNLKASTSAE VGRFIKKLE TSPDILREYI IQLQEHMLTV IPPSTLGARN IHVMMEFLLL  
 ILSMPKDFI HHDKLFDLLA HVGTLTREVS TLVRDLEEKL RNKEGNNQTN CATLDLENI  
 ELLKKDLKHV YLKAPNSSQC CFPMSDGPLF MHLHMHLND LLDSNAYSIS LIKEEIELVS  
 QELEFIRSF GDAAEQGLYK DIWARVLDVA YEAKVIDSI IVRDNGLLHL IFSLPITIKK  
 IKLIKEEISA LDENIPKDRG LIVVNSPKKP VERKSLTDDK IIVGFEEETN LILRKLTSGP  
 ADLVDISITG MPGSGKTTLA YKVYNDKSVS RHFDLRAWCT VDQGYDDKKL LDTIFSQVSG  
 SDSNLSENID VADKLRKQLF GKRYLIVLDD VWDTTTLDL TRPFPEAKKG SRIILTTRK  
 EVALHGKLN DPLDLRLLRP DESWELLEKR TFGNESCPE LLDVKGKIAE NCKGLPLVAD  
 LIAGVIAGRE KKRSVWLEVQ SSLSSFILNS EVEVMKVIEL SYDHLPHHLK PCLLHFASWP  
 KDTPLTIYLL TVYLGAEGFV EKTEMKGIEE VVKIYMDDLI SSSLVICFNE IGDILNFQIH  
 DLVHDFCLIK ARKENLFDRI RSSAPSDLLP RQITIDYDEE EEHFGLNFVM FDSNKKRHSG  
 KHLYSLRING DQLDDSVSDA FHLRHLRLIR VLDLEPSLIM VNDSLLNEIC MLNHLRYLRI  
 RTQVKYLPFS FSNLWNLES FVSNKGSILV LLPRILDV LRVLSVGACS FFDMDADESI  
 LIAKDTKLEN LRILGELLIS YSKDTMNIK RFPNLQVLQF ELKESWDYST EQHWFPKLD  
 LTELETLCVG FKSSNTNHCG SSVATNRPWD FHFPSNLKEL LLYDFPLTSD SLSTIARLPN  
 LENLSLYDTI IQGEEWNMGE EDTFENLKFL NLRLLTSLKW EVGEESFPNL EKLKQECGK  
 LEEIPPSFGD IYSLKFIKIV KSPQLEDSAL KIKKYAEDMR GGNELQILGQ KNIPLFK  
 //

FIGURA 7A

MAFICTYVQL SYSDFEQFED IMTRNRQEVE NLLQSLLDDD VLTSLSNMD DCISLYHRSY  
 KSDAIMMDEQ LDFLLLNLYH LSKHHAEKIF PGVTQYEVLO NVCGNIRDFH GLILNGCIKH  
 EMVENVLPFL QDMAERVGHF LWEDQDDEDS RLSELEDEEH NDRDSRLFQL THLLKIVPT  
 ELEVMIHCYT NLKASTSAEV GRFIKKLEET SPDILREYII QLQEHMLTVI PPSTLGARNI  
 HVMMEFLLLI LSDMPKDFIH HDKLFDLLAH VGTLTREVST LVRDLEEKLR NKEGNNQTNK  
 ATLDLLENIE LLKKDLKHVY LKAPNSSQCC FPMSDGPLFM HLLHMHLNDL LDSNAYSISL  
 IKEEIELVSQ ELEFIRSFYG DAAEQGLYKD IWARVLDVAY EAKDVIDSII VRDNGLLHLI  
 FSLPITIKKI KLIKEEISAL DENIPKDRGL IVVNSPKPV ERKSLTDDKI IVGFEEETNL  
 ILRKLTSIPA DLDVISITGM PGSGKTTLAY KVVNDKSVSR HFDLRAWCTV DQGYDDKLL  
 DTIFSQVSGS DSNLSENIDV ADKLRKQLFG KRYLIVLDDV WDTTTLDELTPPFPEAKKGS  
 RIILTTREKE VALHGKLNLD PLDLRLLRPD ESWELLEKRT FGNESCPDEL LDVKGETAEN  
 CKGLPLVADL IAGVIAGREK KRSVWLEVQS SLSSFILNSE VEVMKVIELS YDHLPHHLKP  
 CLLHFASWPK DTPLTIYLLT VYLGAEGFVE KTEMKGIEEV VKIYMDDLIS SSLVICFNEI  
 GDILNFQIHD LVHDFCLIKA RKENLFDRII SSAPSDLLPR QITIDYDEEE EHFGLNFVMF  
 DSNKKRHSGK HLYSLRINGD QLDDSVSDF HLRHLRLIRV LDLEPSLIMV NDSLLNEICM  
 LNHLRYLRIR TVVKYLPFSF SNLWNLESF VSNKGSILVL LPRILDVVKL RVLSVGACSF  
 FMDADESIL IAKDTKLENL RILGELLISY SKDTMIFKR FPNLQVLQFE LKESWDYSTE  
 QHWFPKLDCL TELETLCVGF KSSNTNHCES SVATNRPWDF HFPSNLKELL LYDFPLTSDS  
 LSTIARLPNL ENLSLYDTII QGEEWNMGEE DTFENLFLN LRLTLKWE VGEESFPNLE  
 KKLQECGKL EEIPPSFGDI YSLKFIKIVK SPQLEDSALK IKKYAEDMRG GNELQILGQK  
 NIPLFK

//

**FIGURA 7B**

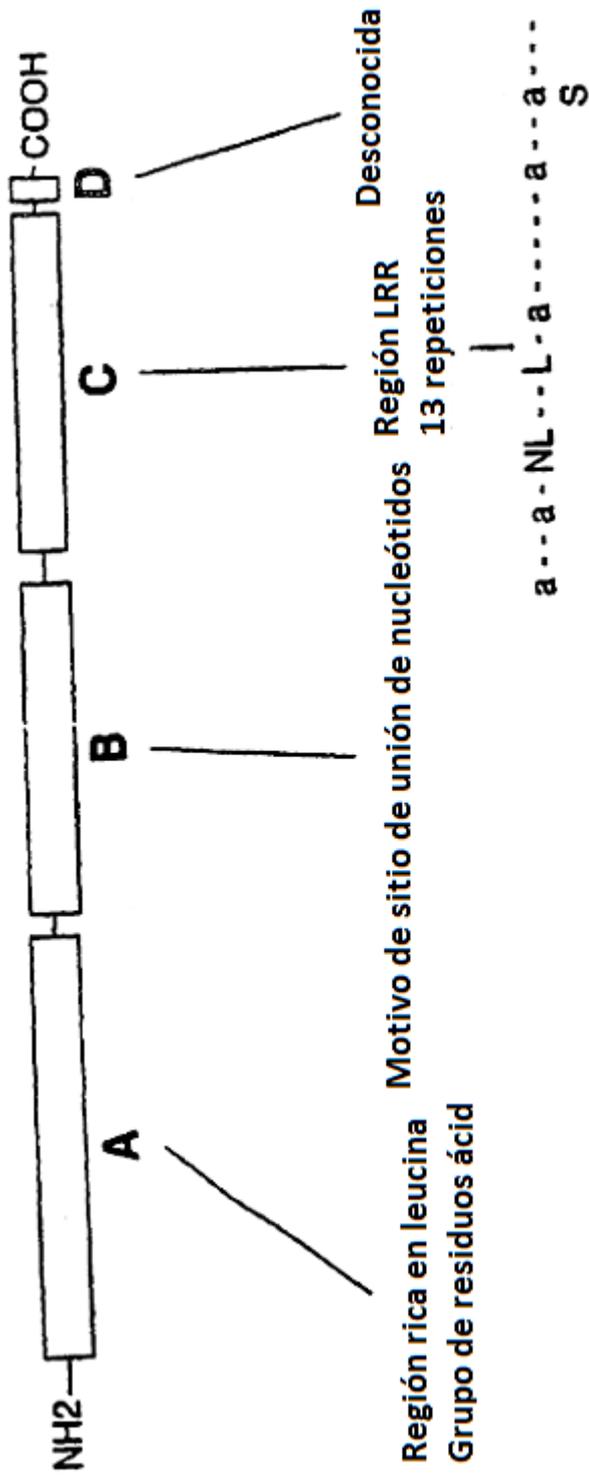


FIGURA 8

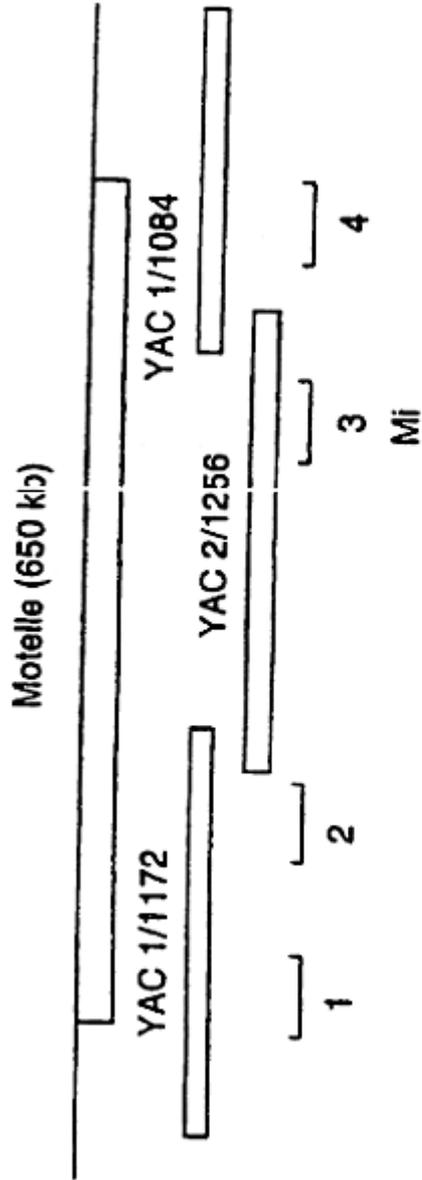


FIGURA 9

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido un gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO renuncia a toda responsabilidad a este respecto.*

5 **Documentos de patentes citados en la descripción**

- EP 0534858 A, Zabeau y Vos [0034] [0064]
- EP 9704340 W [0143]
- EP 96401764 A [0143]
- EP 97401101 A [0143]

10 **Literatura distinta de patentes citada en la descripción**

- **Russell.** Plant Breeding for pest and disease resistance. 1978, 485 [0004]
- **Agrios.** Plant Pathology. Academic Press, Inc, 1988 [0005]
- **Fassuliotis.** Genetic Improvement of Tomato. 1991 [0008] [0010]
- **Gilbert; McGuire.** *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1956, vol. 68, 437-442 [0008]
- 15 · **Kaloshian y col.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 622-625 [0010]
- *Adv. Gen.*, 1956, vol. 8, 29-54 [0010]
- **Tanksley y col.** *Trends in Genetics*, 1995, vol. 11, 63-68 [0011]
- **Dangl.** *Cell*, 1995, vol. 80, 363-366 [0012]
- **Ditta y col.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 7347-7351 [0018]
- 20 · **Staskawicz y col.** *Science*, 1995, vol. 268, 661-667 [0048]
- **Jones; Jones.** *Advances in Botanical Research*, 1997, vol. 24, 89-167 [0048]
- **Gamborg y col.** *Experimental Cell Research*, 1968, vol. 50, 151-158 [0059]
- **Bernatzki; Taksley.** *Theor. Appl. Genet.*, vol. 72, 314-321 [0064]
- **Maxam; Gilbert.** *Methods in Enzymology*, vol. 65, 499-560 [0067]
- 25 · **Van Daelen y col.** *Plant Mol. Biol.*, vol. 12, 341-352 [0070]
- **Burke y col.** *Science*, vol. 236, 806-812 [0071] [0072] [0076]
- **Larin y col.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, 4123-4127 [0072]
- **Sambrook y col.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press [0073]
- **Ross y col.** *Nucleic Acids Res.*, vol. 19, 6053 [0075]
- 30 · **Chu y col.** *Science*, vol. 235, 1582-1585 [0075]
- **Feinberg; Vogelstein.** *Anal. Biochem.*, vol. 132, 6-10 [0077]
- **Jones y col.** *Transgenic Research*, vol. 1, 285-297 [0078]
- **Beck y col.** *Gene*, vol. 19, 327-336 [0078]
- **Odell y col.** *Mol. Gen. Genet.*, vol. 15, 3199-3220 [0078]
- 35 · **Green; Olsen.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 87, 1213-1217 [0079]
- **Korch.** *Nucleic Acids Res.*, vol. 15, 3199-3220 [0082] [0083]
- **Loftus y col.** *Biotechniques*, vol. 12, 172-176 [0082]
- **Sambrook y col.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press [0085] [0106] [0124]
- **Southern.** *J. Mol. Biol.*, vol. 98, 503-515 [0088]
- 40 · **Stevens; Rick.** The Tomato Crop. Chapman and Hall, 1986, 35-109 [0090]

- **Vallejos.** Isozymes in plant genetics and breeding. Elsevier, 1983, 469-515 [0090]
- **Deblaere y col.** *Methods in Enzymology*, vol. 153, 277-292 [0095]
- **Lazo y col.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 963-971 [0096]
- **Ish-Horowicz y col.** *Nucl. Acids Res.*, 1981, vol. 9, 2989-2997 [0098] [0107]
- 5 • **Murashige; Skoog.** *Physiol. Plant.*, vol. 15, 473-497 [0099]
- **Koornneef y col.** Tomato Biotechnology. Alan R. Liss, Inc, 1986, 169-178 [0100]
- **Murashige; Skoog.** *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, 473-497 [0100]
- **Dear; Staden.** *Nucl. Acids Res.*, 1991, vol. 19, 3907-3911 [0108]
- **Horsch y col.** *Science*, 1985, vol. 227, 1229-1231 [0135]
- 10 • **Ooms y col.** *Theor. Appl. Genet.*, vol. 73, 744-750 [0140]