



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 721**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/31** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C07K 14/27** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03075745 .4**  
96 Fecha de presentación : **30.06.1993**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1357189**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2003**

54 Título: **Inductor de la respuesta hipersensible en plantas.**

30 Prioridad: **01.07.1992 US 907935**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.07.2011**

73 Titular/es:  
**CORNELL RESEARCH FOUNDATION Inc.**  
**20 Thornwood Avenue**  
**Ithaca, New York 14850, US**

72 Inventor/es: **Beer, Steven V.;**  
**Wei, Zhong-Min;**  
**Bauer, David W.;**  
**Collmer, Alan;**  
**Laby, Ron y**  
**He, Sheng-Yang**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 362 721 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

Inductor de la respuesta hipersensible en plantas

5 Las plantas así como los seres humanos y los animales, sufren lesiones y pérdidas producidas por infecciones por bacterias. A escala mundial, las bacterias clasificadas en los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* son responsables de la mayoría de las pérdidas producidas por fitopatógenos bacterianos. Muchas de las enfermedades bacterianas de las plantas provocan, de forma esporádica, grandes pérdidas a los agricultores. Las pérdidas son resultado de muerte, deformidad o productividad reducida de las plantas afectadas.

10 Muchos fitopatógenos bacterianos presentan un marcado grado de especificidad hacia las plantas que infectan. Por ejemplo, *Erwinia amylovora* infecta manzano, perales y plantas relacionadas con la familia *Rosaceae*. Otras plantas no enferman cuando se exponen a *E. amylovora*. Sin embargo, cuando se introducen células suficientes de *E. amylovora* en el tejido de las hojas de las otras plantas, el tejido mesófilo se colapsa pasadas unas horas. Este colapso ha recibido el nombre de respuesta hipersensible (RH), y se considera una reacción de defensa de las plantas dado que, durante la RH, las bacterias están delimitadas al interior del tejido colapsado, muriendo eventualmente y por lo tanto no causan daños a toda la planta.

15 Los genes que requieren los fitopatógenos bacterianos para poder inducir la RH, denominados genes *hrp*, por reacción hipersensible y patogenicidad, también son necesarios para provocar la enfermedad. Sin embargo, los productos de genes *hrp* y cómo funcionan en la inducción de la RH y en el desarrollo de la enfermedad, se desconocían antes de la presente invención. La presente invención se refiere a productos de genes *hrp* (inductores) responsables del colapso observado en la RH y que son necesarios para el desarrollo de la enfermedad.

20 Las interacciones entre los patógenos bacterianos y sus plantas huéspedes generalmente pertenecen a dos categorías: (1) compatible (patógeno-huésped), que conduce al crecimiento bacteriano intercelular, al desarrollo de los síntomas y al desarrollo de la enfermedad en la planta huésped; y (2) incompatible (patógeno-no-huésped), que tiene como resultado la respuesta hipersensible, un tipo particular de interacción incompatible, sin síntomas progresivos de la enfermedad. Durante las interacciones compatibles en plantas huésped, las poblaciones bacterianas aumentan drásticamente y se producen síntomas progresivos; durante las interacciones incompatibles las poblaciones bacterianas no aumentan y no se producen síntomas progresivos.

30 La respuesta hipersensible de las plantas superiores se caracteriza por el colapso y muerte rápidos y localizados de los tejidos que contienen un patógeno incompatible (un microorganismo que solo es patógeno en otras plantas) y está asociada con la defensa de las plantas contra muchas bacterias, hongos, nematodos y virus [véase *Phytopathogenic Prokaryotes*, (M.S. Mount and G.H. Lacy eds.) Academic Press, New York. págs. 149-177 (1982)]. En 1963 se demostró por primera vez la inducción de la respuesta hipersensible por bacterias cuando se infiltraron los espacios intercelulares de hojas de tabaco con  $10^7$  células/ml de un patógeno incompatible. Las áreas infiltradas se colapsaron en 24-48 horas y dejaron de favorecer la multiplicación bacteriana (véase *Nature* 199: 299 (1963)]. Por tanto, en la RH, se localiza el patógeno y se limita su posterior crecimiento.

35 La técnica usada en el laboratorio para demostrar la RH es directa. Se infiltran los espacios intercelulares de hojas de tabaco puncionando en primer lugar un sector de una hoja con una aguja de disección recta normal. A continuación, se aplica una jeringa de 1 ml de capacidad (sin aguja), que contiene 0,1-0,5 ml de una suspensión de células bacterianas (normalmente  $10^7$ - $10^8$  células viables/ml) de la bacteria en uno de los laterales de la hoja, directamente sobre la punción. Mientras se presiona con un dedo en el lado opuesto de la hoja para estabilizarla y para evitar que el líquido se escape del área puncionada, se presiona ligeramente el émbolo de la jeringa para introducir la suspensión bacteriana en la hoja. La infiltración se considera satisfactoria cuando en la hoja aparece un área empapada de aproximadamente 1-4 cm<sup>2</sup>.

45 Una hipótesis común propuesta para explicar el mecanismo de inducción de la reacción hipersensible implica la producción de un inductor específico por parte de las bacterias que reacciona con un receptor específico de las células de la planta. Sin embargo, la base molecular (genes y producto de genes) de esta respuesta hacia patógenos potenciales era desconocida antes de la presente invención a pesar de la investigación continuada realizada por fitopatólogos desde que se describió por primera vez la RH en 1963.

Las observaciones fisiológicas y genéticas sugieren que el mismo factor bacteriano que induce la respuesta hipersensible en no-huésped también es necesario para la patogenicidad en huéspedes.

50 La producción del inductor de la respuesta hipersensible está controlada por un conjunto de diversos genes *hrp*, que están muy conservados y que a menudo son intercambiables, entre muchas especies de bacterias fitopatógenas. Aunque otros investigadores han clonado varios genes *hrp* e individuales, se han clonado grupos funcionales de genes *hrp* solo a partir de *Erwinia amylovora* y *Pseudomonas syringae*. Se ha demostrado que estos grupos confieren a bacterias no patógenas la capacidad de inducir la respuesta hipersensible en hojas de tabaco y en hojas de otro tipo [véase *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:132 (1991); *J. Bacteriol* 170:4748 (1988); y Beer y col., *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* (H. Hennecke and D.P.S. Verma eds.) Kluwer Academic Publishers, Boston, págs. 53-60 (1991)].

De acuerdo con la presente invención se proporciona una molécula de ADN aislada que codifica a un polipéptido que induce una respuesta hipersensible en diferentes especies de plantas cuando dicho polipéptido se introduce en el tejido de una planta, en el que el polipéptido inductor de la respuesta hipersensible procede de un patógeno *Erwinia*, comprendiendo dicha molécula de ADN una secuencia de ácido nucleico que puede hibridarse en condiciones rigurosas de lavado, 0,4 x SSC, SDS al 2% a 65°C, con un fragmento *Hind*III de 1,3 kb presente en el plásmido pCPP1084 procedente de la ATCC Depósito 69021.

Preferentemente, el polipéptido que la molécula de ADN codifica, puede inducir una respuesta hipersensible en diferentes especies de plantas cuando dicho polipéptido se introduce en el tejido de la hoja de una planta en condiciones de crecimiento normales.

Preferentemente, el polipéptido codificado pertenece a un inductor de respuesta hipersensible de un patógeno de *Erwinia*, *Pseudomonas* o *Xanthomonas*.

Preferentemente, el polipéptido codificado se caracteriza por una capacidad para inducir una respuesta hipersensible en tejidos de plantas, estabilidad térmica, un alto contenido en glicinas y sustancialmente sin cisteína.

De acuerdo con la presente invención también se proporciona un gen aislado que comprende la molécula de ADN de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con la presente invención también se proporciona una célula huésped que tiene un vector que comprende la molécula de ADN de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con la presente invención también se proporciona un polipéptido aislado codificado por la molécula de ADN de la presente invención. Preferentemente, el polipéptido está purificado o es recombinante.

Inicialmente, se aisló y purificó el inductor de la respuesta hipersensible a partir de *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430) y posteriormente de una cepa natural de *E. amylovora*, la bacteria que provoca una enfermedad en las plantas rosáceas, tales como el manzano y el peral, conocida como fuego bacteriano. Se propone el nombre "harpin" para el inductor de la respuesta hipersensible de *E. amylovora*; se considera que este inductor pertenece al arquetipo de una familia de inductores proteicos de la RH producidos por diferentes bacterias fitopatógenas.

Por tanto, un aspecto de la presente invención es describir proteínas inductoras específicas aisladas de bacterias, que cuando se aplican en plantas no huésped, provocan una respuesta tóxica similar a la respuesta inducida por las células vivas de las bacterias que producen las proteínas. Otro aspecto de la presente invención es el aislamiento y descripción de los genes que codifican las proteínas inductoras, que pueden usarse para hacer que las plantas u otros organismos produzcan proteína inductora, que ejercería sus efectos tóxicos de manera controlada y precisa.

Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar caracterización e identificación suficiente de estas proteínas para permitir el diseño y desarrollo de técnicas que inactiven, destruyan o unan estas proteínas. Este aspecto es deseable ya que se sabe que las bacterias que producen dichas proteínas son necesarias para causar enfermedades en plantas huésped de la bacteria. Al neutralizar los efectos tóxicos de las proteínas se neutralizan sus funciones en la enfermedad y se reduce la enfermedad en las plantas.

Otro aspecto adicional de la presente invención es desarrollar anticuerpos contra estas proteínas, elaborar secuencias de los anticuerpos producidos, construir secuencias de ácido nucleico que al insertarse adecuadamente en el genoma de una planta harían que la planta expresara el anticuerpo y de este modo se evitaría que las bacterias provocaran enfermedades en plantas.

Una parte de la presente invención se basa en la identificación de un gen *hrp* particular del conjunto de genes *hrp* de *Erwinia amylovora*. Este gen particular se transcribe y traduce para obtener el inductor proteico de la respuesta hipersensible. Otra parte de la presente invención trata la identificación de genes homólogos de las especies de *Erwinia*, *Xanthomonas* y *Pseudomonas* que codifican proteínas similares al inductor de RH de *E. amylovora*. Previamente al trabajo de la presente invención, no se había descrito el aislamiento de un inductor proteico de la respuesta hipersensible. Por tanto, otra parte de la presente invención trata una descripción de técnicas para el aislamiento y purificación de un inductor proteico de la respuesta hipersensible. Una parte adicional de la presente invención se refiere a la manipulación genética de los genes que codifican las proteínas inductoras de RH para mejorar la producción de harpin.

Por lo tanto, puede resumirse que las diversas partes y aspectos de la presente invención se refieren a proporcionar profilaxis contra *Erwinia amylovora*, el agente causante del fuego bacteriano del manzano, del peral y de otras plantas rosáceas. Además, la presente invención, se refiere ampliamente a proporcionar profilaxis contra bacterias del género *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* que provocan otras enfermedades en una gran variedad de plantas.

Con objeto de proporcionar un claro entendimiento de la presente invención, se proporcionan los siguientes términos

en relación con las cepas bacterianas, cósmidos y plásmidos mencionados en la descripción de la presente invención.

DH5 $\alpha$	Una cepa de laboratorio de <i>Escherichia coli</i> usada normalmente para la clonación;
Ea321	Cepa de tipo silvestre de <i>Erwinia amylovora</i> a partir de la cual derivan todos los mutantes y clones;
Ea321T143	Mutante Hrp que contiene el transposón Tn5 usado para explorar una biblioteca de cósmidos (en el vector pCPP9) para el restablecimiento de la función Hrp. Esta exploración produjo la identificación del cósmido pCPP430. (Este mutante tiene una inserción en uno de los genes <i>rhp</i> , no <i>rhpN</i> ; el efecto de la inserción es para evitar la expresión de harpin por mutagénesis del operón).
Ea321K49	Mutante Hrp que contiene el transposón Tn10mini-kan que está insertado en un gen <i>hrp</i> implicado en la regulación de la producción de harpin.
Ea321T5	Mutante de <i>hrp</i> que contiene el gen <i>rhpN</i> mutagenizado con el transposón no polar Tn5tac1. (Este mutante de Ea321 tiene una inserción en el gen que codifica la harpin).
pCPP9	Un vector cósmido construido para clonar el ADN de <i>E. amylovora</i> . La parte del vector de pCPP430.
pCPP430	Cósmido que contiene 46,5 kb de ADN de Ea321 que incluye todo el conjunto del gen <i>hrp</i> de Ea321. Este cósmido confiere a <i>E. coli</i> la capacidad de inducir la RH y restablecer el fenotipo Hrp de todos los mutantes Hrp de <i>E. amylovora</i> . Clon del cual derivó <i>hrpN</i> .
pCPP1084	Plásmido que contiene un fragmento de <i>HindIII</i> de 1,3 kb de pCPP430, que incluye todo el <i>hrpN</i> (1155 pares de bases). El vector es pBluescript M13+.
pCPP50	Un plásmido desarrollado modificando el pINIII <sup>113</sup> -A2 de Masui y col. (Bio/Technology, enero 1984 págs. 81-85). Se delecionó un fragmento del original y se insertó un fragmento de pBluescript. Se realizaron las modificaciones para crear un vector más adecuado para la producción de harpin.
pCPP2139	Plásmido que al encontrarse en <i>E. coli</i> tiene como resultado la sobreproducción de harpin. Construido clonando el gen <i>hrpN</i> de pCPP430 en pCPP50
pBluescript M13+	Un plásmido normalmente usado para subclonar y secuenciar ADN. Usado también para la expresión <i>in vitro</i> de proteína de ADN clonado.

Además, estas y otras expresiones usadas en esta descripción pueden encontrarse en Molecular Plant-Microbe Interactions 4(5): 493 (1991) y Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbes Interaction 1: 53 (1991).

- 5 Tanto *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP1084) como *E. amylovora* Ea321 se han depositado en la American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo) en Rockville, Maryland. Sus números de depósito son ATCC 69021 y ATCC 49947, respectivamente. El depósito ATCC 69021 se realizó según el Tratado de Budapest y los cultivos se harán públicos según las disposiciones de ese tratado.

- 10 Los diversos aspectos relativos a la identificación, aislamiento, purificación y caracterización del inductor de RH y los genes, de acuerdo con la presente invención, se entenderán con mayor claridad a partir de las siguientes figuras y ejemplos, todos ellos incluidos con el fin de clarificar la presente invención sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La Figura 1 es un mapa de restricción de endonucleasa del conjunto *hrp* de *Erwinia amylovora*; y

- 15 La Figura 2 describe los cambios de pH de una solución de baño de cultivos en suspensión de células de tabaco.

- Más particularmente, la figura 1 representa el mapa de restricción de endonucleasa del conjunto *hrp* de *Erwinia amylovora* en la que "E" designa EcoRI, "H" designa *HindIII*, y "B" designa sitios de restricción *BamHI*. Las líneas verticales indican la ubicación de las inserciones del transposón que se han ensayado para comprobar sus efectos en cuanto a la capacidad de inducir la RH y de ser patógenos para el peral. Células metabólicamente activas de *Erwinia amylovora* Ea321 [véase Molecular Plant-Microbe Interactions 1(3):135 (1988)] y *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430) con todas las inserciones indicadas no indujeron la reacción hipersensible en tabaco. La región abarcada por todas las inserciones indicadas es esencial también para la inducción de una reacción de intercambio K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de cultivos en suspensión de células de tabaco. Los derivados de Ea321 que contienen todas las inserciones indicadas no son patógenos para el peral.

- 25 Más particularmente, en relación con la Figura 2, antes de su representación gráfica, se restaron los valores de

control (no aditivos). Los cuadrados en blanco representan la harpin (60 nM); los círculos en blanco representan células de *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430) ( $5 \times 10^7$  células/ml); los cuadrados en negrita representan células de *E. amylovora* Ea321 ( $5 \times 10^7$  células/ml); los triángulos representan células de *E. coli*/DH5 $\alpha$ (pCPP430K49) ( $5 \times 10^7$  células/ml); los diamantes representan células de *E. amylovora* Ea321K49 ( $5 \times 10^7$  células/ml); y los círculos en negrita representan células de *E. coli*/DH5 $\alpha$ (pCPP9) ( $5 \times 10^7$  células/ml). Los cultivos en suspensión de células de tabaco se agitaron a temperatura ambiente con los preparados indicados. El pH se midió a los intervalos indicados. Todos los preparados que indujeron la RH en hojas de tabaco también provocaron un aumento del pH en el medio de cultivo en suspensión de células de tabaco.

#### EJEMPLO I

Se identificó el plásmido pCPP430 a partir de una genoteca de ADN genómico de la cepa de tipo silvestre de *E. amylovora*, conocida en nuestro laboratorio como Ea321 y se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo como 49947. La cepa se recibió en 1978 procedente de la Colección Nacional Francesa de bacterias Fitopatógenas, en la que recibe el nombre CNFB 1367. El ADN genómico se aisló y se digirió con *Sau3A*, se ligó en el vector cósmido de pCPP9 previamente digerido con *Bam*HI, se empaquetó y se transfirió en la cepa ED8767 de *E. coli* de acuerdo con procedimientos previamente descritos [véase Mol. Plant-Microbe Int. 1: 135 (1988)]. Los cósmidos resultantes se movilizaron en cepas por conjugación usando el plásmido auxiliar pRK2013 [Bauer, D.W., Molecular genetics of pathogenicity of *Erwinia amylovora*: techniques, tools and their application. Ph. D. thesis. Cornell University, Ithaca, NY (1989)].

La biblioteca resultante se diluyó y se dispersó en placas de agar nutriente que contenía espectinomicina y kanamicina a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml. Se seleccionaron placas que contenían aproximadamente 500 colonias, tras una incubación a 37 °C durante 24 horas, cuando el diámetro de cada colonia era de 0,5-1,0 mm. Las colonias procedentes de estas placas se repicaron en placas que contenían agar Luria-Bertani (LA) en las que previamente se había extendido 0,1 ml de una suspensión de cepa Ea321T134. Ea321T143 es una cepa mutante de Hrp inducida por Tn10 de Ea321; no es patógena para el peral y no induce la RH en tabaco ni en otras plantas. Se hizo crecer hasta una D.O.<sub>620</sub>=1,3 en caldo Luria más tetraciclina (10  $\mu$ g/ml). Las placas de LA se incubaron durante 5 horas a 28°C y su crecimiento en estas placas se repicó en un medio mínimo para el crecimiento de *Erwinia amylovora*, que contenía glucosa 2 g/l, asparagina 1,5 g/l, citrato de sodio 0,25 g/l, MgSO<sub>4</sub> 5 mg/l, ácido nicotínico 0,25 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,51 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,51 g/l y 50 mg/l de espectinomicina y 10 mg/ml de tetraciclina. Este procedimiento seleccionó transconjugados de Ea321T143 que contenían diversos cósmidos de la biblioteca Ea321. Después de 48 horas de incubación a 28 °C, se prensaron rodajas de pera inmadura recién cortada sobre la superficie de cada placa de transconjugados de manera que todas las colonias que estaban debajo de la rodaja de pera estaban en contacto con tejido de la pera. Las rodajas de pera se invirtieron, se incubaron en cajas de plástico envueltas con toallas de papel bien humedecidas y se observaron diariamente durante hasta 5 días para determinar la presencia de gotitas de exudado. La pera inmadura se había cosechado aproximadamente 6 semanas después de la floración de árboles de *Pyrus communis* cv. Bartlett. Los frutos tenían 2-4 cm de diámetro y se almacenaron a 0-2°C hasta el momento de su uso. Según se usa en esta descripción de la presente invención, el exudado es una mezcla de productos de la planta y de la bacteria formada en gran parte por células bacterianas vivas.

El exudado se mantuvo en dilución en placas de medio mínimo con *E. amylovora* con 50  $\mu$ g/ml de espectinomicina y 10  $\mu$ g/ml de tetraciclina, se incubó durante 2 días a 28 °C y con palillos estériles se recogieron colonias individuales, se propagó en una placa nueva de agar mínimo Ea + 50  $\mu$ g/ml de espectinomicina y 10  $\mu$ g/ml de tetraciclina y se volvió a ensayar para determinar la patogenicidad. En el tejido de la pera recién cortada se introdujeron palillos contaminados con las cepas a ensayar. Los cósmidos de las colonias que provocaron la enfermedad en la pera se removilizaron en DH5 $\alpha$  desde Ea321T143 combinando 0,5 alícuotas de cultivos de antibiótico + LB durante una noche de DH5 $\alpha$ , el transconjugante path<sup>+</sup> Ea321T143 (la cepa de Ea321T143 que contiene el cósmido que confiere a Ea321T143 la capacidad de provocar la enfermedad), y pRK2013, el plásmido auxiliar. La combinación se mezcló cuidadosamente, se centrifugó y el sedimento se suspendió en 150  $\mu$ l de caldo L, sin antibióticos. El sedimento se resuspendió cuidadosamente y se colocaron 0,1 ml de gotas en placas LA, se permitió la impregnación en el agar sin esparcirse, y después se incubaron las placas a 28 °C durante 5 h. Tras la incubación, el cultivo puntual se resuspendió en 1 ml de tampón de fosfato de potasio 5 mM, a pH 6,5, y se dispersaron 0,1 alícuotas sobre las placas de LA + 50  $\mu$ g/ml de espectinomicina y 20  $\mu$ g/ml de ácido nalidíxico, que después se incubaron durante 48 h. a 37 °C. Las colonias se transfirieron simultáneamente con palillos a placas de LA + 50  $\mu$ g/ml de espectinomicina y LA + Km. Se seleccionaron las colonias que crecieron solo en las placas de 50  $\mu$ g/ml de espectinomicina, lo que indicaba la pérdida del plásmido auxiliar pRK2013 (Km<sup>r</sup>), para su conservación por congelación y para continuar con su estudio.

Para determinar si el mismo cósmido que restableció la patogenicidad a la pera, en lo sucesivo en este documento denominado pCPP430, también afectaba a la reacción de Ea321T143 en el tabaco, se infiltraron suspensiones en sectores de hojas de tabaco. El efecto de pCPP430, mantenido en *E. coli* DH5 $\alpha$  se ensayó en tabaco. Se cultivó la cepa a una DO<sub>620</sub> de 0,4- 0,6 (aproximadamente 10<sup>8</sup> ufc/ml) en caldo Luria + 50  $\mu$ g/ml de espectinomicina. Se centrifugó el cultivo (12.000 x g durante 1 minuto), se resuspendió en tampón fosfato 5 mM a pH 6,5, hasta el volumen original y se infiltró en hojas de tabaco. El colapso del tejido se produjo en 8 horas. No se observó colapso cuando se infiltraron las células de DH5 $\alpha$ (solo) o DH5 $\alpha$ (pCPP9) en las hojas de tabaco. Por lo tanto, los autores de

la invención llegan a la conclusión de que pCPP430, que contiene ADN particular de *E. coli* DH5 $\alpha$  con Ea321 habilitada provoca la reacción de RH y que pCPP430 contiene todos los genes necesarios para esta reacción.

El gen *hrp* de *E. amylovora* contenido en el cósmido pCPP430, se expresa particularmente bien en *Escherichia coli* [véase *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, anteriormente; *Phytopathology* 79:1166 (1989); and *Mol. Plant-Microbe Interactions* 4(5): 493 (1991)]. Normalmente la síntesis de ARN nuevo y de proteínas fue necesaria para que Ea321 indujera la RH. Sin embargo *E. coli* (pCPP43) y Ea321(pCPP430) pueden inducir la RH en presencia de inhibidores transcripcionales o traduccionales tales como rifampicina y tetraciclina. Esto indicó que el inductor de la RH estaba presente en/sobre células de *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430) antes de infiltrar la bacteria en las hojas de tabaco.

La búsqueda del inductor de la RH comenzó infiltrando en las hojas de tabaco los sobrenadantes del cultivo sin células de *E. amylovora* Ea321, Ea321(pCPP430) o *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430). Los sobrenadantes se produjeron cultivando cada cepa en caldo LB con el antibiótico apropiado hasta la fase logarítmica tardía (D.O.<sub>620</sub> = aprox. 1,0). Como se esperaba, en base a la experiencia de otros colaboradores [véase *Phytopathology* 57: 322 (1967)], no se produjo respuesta hipersensible.

La cepa Ea321(pCPP430) se creó mediante el siguiente procedimiento:

#### EJEMPLO II

Se cultivaron cepas Ea321, *E. coli*/DH5 $\alpha$ (pCPP43) y *E. coli*/DH5 $\alpha$ (pRK2013) durante una noche en caldo LB que contenía, respectivamente, ningún antibiótico, 50  $\mu$ g/ml de espectinomicina ó Km<sup>50</sup>. La mañana siguiente, se combinaron 0,5 ml de alícuotas de cada cepa, en un tubo de microcentrifugación, se centrifugaron durante 2 minutos y se resuspendieron en 0,15 ml de caldo Luria (sin antibióticos). Se aplicó una alícuota de 0,1 ml de esta suspensión en agar Luria (sin antibióticos) y se incubó durante 5 h a 28 °C. El cultivo de esta zona se resuspendió en 1 ml de tampón fosfato de potasio 5 mM, a pH 6,5, y se sembraron alícuotas de 0,1 ml en placas de medio mínimo de *E. amylovora* que contenía 50  $\mu$ g/ml de espectinomicina para seleccionar las cepas de Ea321 que albergaban pCPP430. Las placas se incubaron durante 2-3 días a 28 °C. Colonias individuales se trasladaron con palillos de manera simultánea a un medio mínimo que contenía 50  $\mu$ g/ml de espectinomicina y un medio mínimo que contenía KM<sup>50</sup>. Solamente se seleccionaron, para estudio posterior, las colonias que crecieron en el medio con 50  $\mu$ g/ml de espectinomicina (lo que indica la selección de pCPP430) pero no en el medio con Km<sup>50</sup> (lo que indica la pérdida del plásmido auxiliar pRK2013).

Aunque los sobrenadantes del cultivo sin células de todas las bacterias usadas no indujeron la respuesta hipersensible, los preparados de algunas células de una forma nueva dieron como resultado preparados sin células que inducían una fuerte respuesta hipersensible en 12 horas que no podía distinguirse de la inducida por las células bacterianas metabolizadoras a partir de las cuales se habían elaborado los preparados. El inductor de la respuesta hipersensible se aisló, se purificó y se caracterizó del preparado de inducción sin células (CFEP, siglas en inglés) según el Ejemplo III.

En el siguiente ejemplo se describe el aislamiento del CFEP con harpin de DH5 $\alpha$ (pCPP430) de *E. coli* de acuerdo con la presente invención:

#### EJEMPLO III

Se cultivaron células de DH5 $\alpha$ (pCPP430) de *E. coli* en medio Luria-Bertani (LB) a una DO<sub>620</sub>=0,8, se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en una décima parte del volumen original en tampón fosfato de potasio 5 mM, a pH 6,5, con 0,1 mM de fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), un inhibidor de la serina proteasa. Después las células se rompieron por exposición a ultrasonidos usando un Sonicator Ultrasonic Cell Disruptor™ (Sistema Térmico Ultrasonidos) con una potencia de 4, y ajustando el programador de ciclo de pulsos a 40% del coeficiente de utilización (en estas condiciones, se trataron con ultrasonidos 10 ml de suspensión bacteriana durante 10 min. en hielo). Después se retiraron los desechos del tratamiento con ultrasonidos por centrifugación a 12.000 x g durante 1 hora, el líquido sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,2  $\mu$ m para extraer las células intactas restantes. El preparado resultante, en diluciones de hasta aproximadamente 1:10, pudo inducir la respuesta hipersensible en las hojas de tabaco. El CFEP contenía el material intracelular de un cultivo de DO<sub>620</sub>=0,4, la misma densidad de células vivas de *E. coli* necesaria para inducir la respuesta hipersensible.

La purificación de harpin de acuerdo con el presente ejemplo se describe en el siguiente ejemplo:

#### EJEMPLO IV

Experimentos iniciales que usaban el preparado obtenido del Ejemplo III indicaron que la actividad de inducción de la RH era termoestable y de naturaleza proteica. El preparado conservó actividad de inducción de RH según se determinó por la infiltración de hojas de tabaco como se ha descrito anteriormente, tras la incubación durante una noche a 65°C. Sin embargo, excepto con PMSF, el inhibidor de la serina proteasa se había añadido durante la preparación, toda la actividad de inducción de la RH se perdió después de 3 horas a 37 °C ó 6-8 horas a 4 °C. La

incubación del preparado con pronasa E (Sigma) a 100 µg/ml, durante 1 hora a 37 °C destruyó cualquier actividad inductora.

La ventaja de la termoestabilidad del preparado inductor se usó para ayudar en la purificación adicional del inductor. Solamente un número limitado de proteínas permaneció tras mantener el preparado inductor del Ejemplo III en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y tras la posterior retirada del material insoluble por centrifugación. Destacó una banda, correspondiente a 44 kD, después de electroforesis del preparado calentado del Ejemplo III en geles de SDS-poliacrilamida (se prepararon geles de SDS-PAGE al 10% y se usaron de acuerdo con las instrucciones del proveedor, Hoeffer Scientific Instruments; la proteína en los geles se tiñó con Azul de Coomassie R-250 al 0,025% durante 30 min. y se destiñó con solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%). Una banda con esta movilidad estuvo presente excepcionalmente en todos los preparados con actividad inductora de RH. Después de la determinación del preparado del Ejemplo III en un lecho de gel granulado con isoelectroenfoque o mediante cromatografía de intercambio iónico, las fracciones con actividad de inducción de RH siempre contenían una proteína que correspondía a un tamaño molecular de 44 kD con un pH de 4,0 a 4,5.

Para lograr una mayor purificación de la harpin, se aplicaron diversas técnicas de separación a los CFEP preparados como se describe en el Ejemplo III. Antes de cada etapa, el CFEP se calentó en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, se enfrió a 25-30°C y se centrifugó durante 10 min. a 12.000 x g. El líquido sobrenadante se retuvo y se filtró a través de una membrana de filtración con un tamaño de poro de 0,2 µm (Millipore, MF).

El CFEP tratado con calor se unió a una resina de intercambio aniónico (Whatman DE-52) y se eluyó gradualmente con cantidades en aumento de KCl en tampón fosfato de potasio 5 mM, a pH 6,5. La harpin se eluyó de la columna con tampón que contenía KCl 90 mM. La presencia de harpin se determinó por infiltración de sectores de hojas de tabaco con elementos procedentes de la columna que se habían concentrado hasta un 50% del volumen inicial. Además, se sometieron a electroforesis fracciones en geles SDS-PAGE de acuerdo con procedimientos convencionales. La purificación final se obtuvo con cromatografía líquida de alta Presión (HPLC). Los preparados purificados por cromatografía de intercambio iónico se ajustaron a pH 2 mediante la adición de ácido acético y posterior centrifugación para eliminar cualquier precipitado, se aplicaron a una columna previamente rellena de HPLC de fase inversa (YMC AQ-303). La columna se eluyó con un gradiente de 10-70% de acetonitrilo a pH 2 en ácido trifluoroacético 0,25% p/v. La detección de la proteína se realizó por absorción de luz de 190 nm a 300 nm. Cada fracción de 0,25 ml se ensayó para determinar la capacidad de inducir la RH por infiltración de sectores de la hoja de tabaco.

El lecho de gel granulado usado para la resolución del preparado del Ejemplo III se preparó con Bio-lyte™ (Bio-Rad Laboratories) según recomienda el fabricante. Se usaron anfolitos de amplio espectro, a pH 3-10 (Sigma) a una concentración final en la emulsión del 2%. Las soluciones del electrodo fueron 1 M de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (ánodo) y 1 M de NaOH (cátodo).

Para determinar si la banda de proteína 44 kD ("harpin") predominante presente en todas las muestras inductoras de RH, poseían actividad inductora, se cortó la región sin teñir apropiada del gel SDS preparatorio y se sometió a electroelución con tampón sin SDS. La proteína eluída (200 µg/ml) se dializó durante una noche frente a 2 litros de tampón fosfato de potasio 5 mM, a pH 6,5, que contenía fenil metil sulfonil fluoruro 0,1 mM. A concentraciones ≥500 nM (≥25 µg/ml), harpin indujo la respuesta hipersensible en las hojas de todas las plantas ensayadas, incluyendo las de tabaco, tomate y *Arabidopsis thaliana*.

La experimentación posterior confirmó que harpin era sensible a la proteasa, termoestable y ácida. El tratamiento de harpin con proteasa suprimió la capacidad de inducción de la RH y eliminó la banda de proteína de 44 kD de los geles de SDS poliácridamida. Sin embargo, cuando harpin se incubó con proteasa que se había mantenido a 100°C durante 10 minutos para inactivar la enzima, el preparado conservó la actividad inductora de RH. Cuando proteasa activa estaba presente en la mezcla de infiltración, no se desarrolló respuesta hipersensible. Sin embargo, la infiltración de las hojas de tabaco solo con proteasa activa o inactivada mediante calor no dio como resultado ningún síntoma macroscópico. La harpin conservó su actividad inductora de RH después de calentar en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. La harpin purificada a partir de un gel de SDS presentó un pH de 4,3 según se determinó por resolución en geles de isoelectroenfoque de placa fina usando técnicas convencionales.

La ubicación subcelular de la harpin de acuerdo con la presente invención se describe en el siguiente ejemplo:

#### 50 EJEMPLO V

La ubicación de la harpin en la superficie de celular del organismo se sugirió al efectuarse las siguientes observaciones: (i) el sobrenadante de *E. amylovora* Ea321(pCPP430) ó *E. coli* DH5α(pCPP430) no indujo la respuesta hipersensible, lo que indica que la harpin no se secreta en el medio, sino que está presente en o sobre la bacteria; (ii) después de la incubación a 37°C durante 5 min de todas las células Ea321(pCPP440) y *E. coli* DH5α(pCPP430) con 40 y 80 µg/ml de proteasa, respectivamente, y con 40 µg/ml de tetraciclina para detener la producción continuada de harpin, la bacteria no pudo inducir una respuesta hipersensible. Cuando se incluyó PMSF 0,5 mM, el inhibidor de la proteasa, en la mezcla de incubación anterior, la bacteria indujo la respuesta hipersensible; aparentemente, el PMSF protegió a la harpin de la inactivación por proteasa. (La infiltración de hojas de tabaco con

PMSF o solo con tetraciclina no tuvo ningún efecto, lo que indica que ningún compuesto funciona de manera independiente provocando la RH); (iii) el tratamiento de bacterias con cantidades en aumento de proteasa dio como resultado una reducción de la capacidad para inducir la respuesta hipersensible, que se correlaciona bien con la desaparición de harpin de los geles SDS en los que se había sometido a electroforesis la bacteria tratada con proteasa [Tabla 1]; (iv) después de la centrifugación del preparado del Ejemplo III a 105.000 x g durante 1 hora, se encontró la mayoría de actividad inductora de RH en el líquido sobrenadante, sin embargo, al añadir MgCl<sub>2</sub>, 30 mM, un estabilizador de membrana, antes de someterlo a ultrasonidos, la mayoría de la actividad estaba asociada al sedimento, que es la parte centrifugada que contiene las membranas; y (v) la cromatografía de permeación en gel del preparado sin hervir del Ejemplo III indicó la asociación del inductor con una fracción de peso molecular muy elevado (> 10<sup>6</sup> D) que eran posiblemente vesículas de membrana y (vi) el fraccionamiento de las células lisadas de Ea321(pCPP430) [véase Science 233: 1403 (1985)] en la ultracentrifugadora y la reacción con un anticuerpo específico de harpin, solo dio como resultado la reacción con la fracción de membrana de la célula y el control de toda la célula.

Los resultados anteriores indican que harpin se localiza en o cerca de la superficie celular bacteriana y que es inestable. Las suspensiones celulares de Ea321(pCPP430) ó *E. coli* DH5α(pcPP430) mantuvieron su actividad inductora de RH durante no más de 0,5 h y 1 h, respectivamente, en presencia de tetraciclina (40 µg/ml), un inhibidor de la traducción. Además, cuando las células perdieron la actividad inductora de RH, no se detectó harpin. Sin embargo, cuando el inhibidor de proteasa PMSF (0,5 mM) se incluyó en la suspensión, la bacteria conservó la actividad inductora de RH durante más de dos horas, y simultáneamente se detectaron cantidades en descenso de harpin en los geles SDS con el paso del tiempo. Partiendo de un mismo número de células, se necesitó más proteasa para destruir la harpin y evitar la reacción hipersensible para *E. coli* DH5α(pcPP430) que para Ea321(pCPP430). Por tanto, la sensibilidad de la harpin a la proteólisis puede explicar las observaciones previas de la breve naturaleza de la capacidad de inducción de HR de bacterias fitopatógenas [véase Science 245: 1374 (1989)].

El siguiente procedimiento y la Tabla 1 ilustran el protocolo y los resultados de la sensibilidad a la proteasa de la actividad inductora de HR de *E. amylovora* Ea321 que contiene su conjunto de genes hrp.

Se cultivaron células de *E. amylovora* Ea321(pCPP430) en medio LB y se recogieron a una D.O.<sub>620</sub> = 0,6 por centrifugación. Después, las células se resuspendieron en un volumen de 0,1 de tampón fosfato de potasio 5 mM, a pH 6,5, que contenía 40 µg/ml de tetraciclina. Se añadió proteasa (como se indica en la Tabla 1) a 200 µl de suspensión celular y se incubó a 37°C durante 5 minutos y posteriormente se infiltraron 100 µl de cada mezcla en hojas de tabaco. Se observó colapso 24 horas después de la infiltración. Se mezclaron 20 µl de tampón de separación 5x con 80 µl de las mezclas restantes, se hirvió durante 5 minutos y después se centrifugó durante 10 minutos en una microcentrifugadora, antes de cargar 15 µl en cada carril de un gel SDS-PAGE al 10%. La electroforesis se realizó durante 2 horas a 20 mA, seguido por tinción con Azul de Coomassie R-250 al 0,025% durante 30 min y se destiñó con solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%. El sobrenadante sin células producido a partir del cultivo LB se esterilizó por filtrado y después se concentró a una décima parte del volumen original con Centriprep-10 (Amicon). El tratamiento con niveles más elevados de proteasa dio como resultado la pérdida de la capacidad de inducción RH y la desaparición de la banda de harpin (44 kD) de los geles SDS. Los datos resultantes de este protocolo se describen en la siguiente tabla:

TABLA 1

Proteasa/ml	Inducción de RH en Tabaco	Harpin detectada
0 µg	+	+
5 µg	+	+
10 µg	+	+
20 µg	Débil	+
40 µg	-	-
80 µg	-	-
80 µg + PMSF 0,5 mM	+	+
sobrenadante sin células	-	-

+ = una reacción positiva;

- = una reacción negativa



La capacidad de las cepas bacterianas para inducir la respuesta hipersensible en hojas de tabaco intactas se correlaciona fuertemente con su capacidad para inducir una reacción de intercambio  $K^+/H^+$  en cultivos en suspensión de células de tabaco. Las dos reacciones están genéticamente relacionadas, ya que se necesita una parte importante del conjunto de genes *hrp* de *E. amylovora* para inducir la reacción de intercambio  $K^+/H^+$ . Por tanto, de acuerdo con el siguiente ejemplo, se comprobó el efecto de la harpin en cultivos en suspensión de células de tabaco.

En el siguiente ejemplo se describe el efecto de harpin en plantas, células y tejidos de plantas de acuerdo con la presente invención:

#### EJEMPLO VI

Para determinar si un preparado en particular poseía actividad inductora de RH, se usó una técnica similar a la usada con células bacterianas completas [véase Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 494 (1991)]. Se cultivaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. "Xanthi") en una mezcla de tierra artificial, hasta una altura de 90-100 cm. Se llevaron las plantas del invernadero al laboratorio <24 horas antes de la infiltración. La infiltración de la lámina de la hoja se realizó con una jeringa sin aguja a través de un pequeño orificio efectuado con una aguja de disección. El colapso de la zona infiltrada, indicativo de la RH, se registró 24 horas después de la infiltración.

Todas las CFEP que contenían la proteína de 44 kD, según se detecta mediante SDS-PAGE, causó colapsos de las zonas infiltradas de las hojas de tabaco. La harpin, purificada por HPLC (Ejemplo IV) indujo la RH a concentraciones  $\geq 500$  nM.

Para ensayar el efecto de la harpin en cultivos en suspensión de células de tabaco, se obtuvieron cultivos en suspensión de células de tabaco de cuatro días de vida (*Nicotiana tabacum* var. *Samsun*) del programa biotecnología de la Universidad de Cornell. La suspensión celular se filtró a través de una sola capa de gasa de tejido abierto en un vaso de precipitado de 1 litro para eliminar las masas aglomeradas grandes. Se usó Medio de Ensayo de Tabaco [MES 0,5 mM, manitol 0,175 M.  $K_2SO_4$  (2 ml de una solución madre 0,25 M),  $CaCl_2$  (2 ml de una solución madre de 0,25 M) 996 ml de agua de gran pureza, se ajustó a pH 6,0 con NaOH 1N y se filtró a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,2  $\mu m$ ] para eliminar tantas células como fuera posible a través de una sola capa de gasa. Esta suspensión lavada y filtrada se vertió después en un embudo de gran tamaño forrado con una capa de Miracloth™ (tela no tejida) y se lavaron cuidadosamente las células que recubrían el Miracloth™ con un Medio de Ensayo de Tabaco de 200-400 ml adicional. Se pesaron 15 g de células húmedas y se resuspendieron cuidadosamente en 415 ml de Medio de Ensayo de Tabaco. Se midieron alícuotas de 20 ml de esta suspensión en vasos de plástico cónicos (diámetro superior de 4 cm; diámetro inferior de 2,5 cm; 4 cm de altura) y se colocaron inmediatamente en un agitador giratorio ajustado a 150 rpm con un avance de 2 cm y se mantuvo a  $25 \pm 3^\circ C$ .

Se permitió que las células se equilibraran hasta que alcanzaron un pH de aproximadamente 5,8 (normalmente 20-30 min). Llegado a este punto, a cada muestra de célula de tabaco, se añadió 1 ml de suspensión bacteriana, o extracto expuesto a ultrasonidos, ó 0,5 ml de proteína purificada que contenía 20  $\mu l$  de un concentrado de 20  $\mu g/ml$  de PMSF. El pH de la muestra se leyó con un peachímetro de Corning y se volvió a ajustar a pH 6 con NaOH 0,1 N (ó HCl 0,1 N según corresponda). La segunda lectura se tomó 30 minutos después de la primera lectura. Todas las lecturas posteriores se tomaron a intervalos de una hora hasta pasadas 6 horas tras la lectura en el momento 0. Todos los tratamientos se ensayaron por duplicado.

Las suspensiones de células bacterianas se prepararon cultivando durante una noche cultivos en LB con el antibiótico apropiado y después se volvió a diluir las cepas hasta una  $DO_{620}$  de 0,20 a la mañana siguiente. Se volvió a cultivar los cultivos a una  $DO$  de 0,4. A esta  $DO$ , se calculó que las cepas de Ea321 y sus derivados tenían una concentración de aproximadamente  $2 \times 10^8$  ufc/ml. Se calculó que cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y sus derivados tenían una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/ml. Las células se centrifugaron a 5000 x g y se resuspendieron para producir concentraciones 5 veces mayores (para Ea321 y sus derivados) y 10 veces mayores (para *E. coli* y derivados) en tampón MES 1 mM a pH 6. De esta manera, se consiguieron concentraciones de células de aproximadamente  $1 \times 10^9$  ufc/ml. Cuando se añadió una suspensión de células de 1 ml a 20 ml de suspensión de células de tabaco, la concentración final de ufc/ml del ensayo se calculó en  $5 \times 10^7$  por ml.

Las células de *E. amylovora* produjeron un aumento de pH de la solución de baño (una medida de la reacción de intercambio  $K^+/H^+$ ) con un retraso de 2-3 h después de añadir la bacteria al cultivo de suspensión de células de tabaco (véase la figura 2). Por el contrario, una única adición de harpin en el momento cero provocó un aumento rápido del pH de la solución de baño durante la primera hora. El pH disminuyó ligeramente durante la siguiente incubación. Los mutantes de *E. amylovora* que no producen harpin *in vitro* no pudieron inducir la reacción de intercambio  $K^+/H^+$ . Las cepas de *E. coli* contienen mutaciones en el conjunto de genes *hrp* clonados de *E. amylovora* tampoco indujeron la reacción de intercambio. La inducción de la reacción de intercambio, así como la reacción hipersensible, de la harpin proporciona pruebas adicionales de que la harpin es activa en las interacciones bacteria-planta. Los datos precedentes de estos estudios sobre el efecto de harpin en cultivos de células de tabaco se presentan en la Figura 2.

El siguiente ejemplo proporciona una comparación de la harpin obtenida a partir de *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430) y de la obtenida de Ea 321.

#### EJEMPLO VII

5 Para demostrar que *E. amylovora* produce harpin y no *E. coli* estimulada por la presencia de pCPP430, se usaron las mismas técnicas para su aislamiento a partir de *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430) con *E. amylovora* Ea321, excepto que las células se preincubaron en un medio inductor de RH durante 5 horas antes de exponerlas a ultrasonidos. Además, *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP9), que alberga el vector pCPP430, se sometió a los mismos procedimientos que *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430). Una proteína aislada con el mismo peso molecular que la aislada de Ea321, poseía capacidad inductora de RH. Basándose en la intensidad relativa de la banda de 44 kD en los geles de SDS poliacrilamida, se calculó que *E. amylovora* Ea321 produce, en cada célula, aproximadamente una décima cantidad de harpin que la que produce *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430). Las propiedades de la proteína inductora de *E. amylovora* Ea321 y *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430) fueron idénticas. No se observó actividad inductora de RH termoestable y sensible a proteasa asociada con una proteína de 44 kD en los extractos acelu-  
10 lares obtenidos a partir de *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP9).

15 Las propiedades de la harpin de *E. amylovora* fueron consistentes con diversas observaciones fisiológicas importantes que se realizaron tras descubrir que las bacterias pueden inducir la respuesta hipersensible. La infiltración de tejidos de plantas con patógenos incompatibles e inhibidores de la proteína bacteriana o de la síntesis de ARN impide la respuesta hipersensible [véase *Phytopathology* 72: 1513 (1982)] lo que indica que es necesario el nuevo ARN y la síntesis de proteínas. Cuando las bacterias se infiltran en agar diluido en agua, no se induce respuesta hipersensible, lo que sugiere que es necesario el contacto íntimo entre las bacterias y las células de la planta. Las bacterias preinducidas perdieron rápidamente la capacidad de inducción de RH cuando se infiltran con inhibidores traduccionales o transcripcionales [véase *Science* 245: 1374 (1989)]. Otras pruebas de que el inductor es un componente de la superficie celular bacteriana se han encontrado en observaciones de que el inductor no es difundible en tejido infiltrado de plantas y que cada bacteria introducida destruye solo una célula de la planta. Como pronosticaron estas observaciones, la harpin está asociada con la superficie celular bacteriana y aparece con una naturaleza inestable debido a su extrema sensibilidad a la proteólisis. Por tanto, la degradación de la harpin puede ser importante en la regulación del desarrollo de la interacción planta-bacteria.  
20  
25

El fenotipo no patógeno de los mutantes de *hrp* sugiere que la harpin es también un factor primario determinante de la patogenicidad en *E. amylovora*. La base de la función esencial de la harpin tanto en interacciones compatibles (huésped:enfermedad) como en incompatibles (no huésped:respuesta hipersensible) no está clara. El intervalo de huéspedes de algunas bacterias fitopatógenas se ha demostrado estar controlado por genes *avr* que pueden conferir incompatibilidad específica del cultivo a patógenos *hrp*<sup>+</sup>. La actividad bioquímica de los productos de genes *avr* y la base de su dependencia de los genes *hrp* para la expresión fenotípica se desconoce, aunque *avrB* se regulada mediante genes *hrp*. La regulación de la producción o acumulación de harpin también puede ser un factor determinante; los grupos de genes *hrp* en *E. amylovora* se expresan aproximadamente 10 veces menos en tejido huésped (pera) que en tejido no huésped (tabaco).  
30  
35

Aunque se han identificado los principales determinantes de la enfermedad en bacterias fitopatógenas que producen tanto tumores como maceración extensiva del tejido (fitohormonas y enzimas pécticas, respectivamente), la base molecular de la patogenicidad entre bacterias que causa necrosis retardada en un intervalo limitado de huéspedes se desconoce. Entre estas bacterias se encuentran las patovarietades económicamente importantes *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas campestris*. Las toxinas y las enzimas degradadoras de la pared celular vegetal pueden aumentar la virulencia de estos patógenos, pero los genes *hrp* son absolutamente necesarios para la multiplicación bacteriana en tejidos huésped y para la producción de síntomas de la enfermedad.  
40

La conservación de los genes *hrp* [véase Laby, R. J., *Molecular studies on pathogenicity and virulence factors of Erwinia amylovora*, M.S. Thesis, Cornell University (1991)] sugiere que la harpin de *E. amylovora* es el arquetipo de una clase muy importante de determinantes de enfermedad bacteriana de la planta. Por tanto, la modificación de harpin o del correcto equilibrio de su producción sería una nueva estrategia para controlar la frecuencia de las enfermedades bacterianas en plantas de cultivo. El modo de acción de la harpin también revelaría la base molecular de la respuesta hipersensible y de la resistencia de plantas a una amplia gama de patógenos microbianos.  
45

El siguiente ejemplo proporciona una descripción de la determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal mediante la cual se localizó el gen que codifica la harpin.  
50

#### EJEMPLO VIII

Para localizar el gen que codifica harpin, denominado *hrpN*, se determinó la secuencia parcial de aminoácidos de la proteína harpin. Se usó una muestra de harpin (25  $\mu$ g) purificada por HPLC según el Ejemplo IV. Para eliminar el disolvente de acetonitrilo, se evaporó hasta casi sequedad en vacío una parte del eluido de la columna cromatográfica de fase inversa correspondiente a la elución pico a 42,5 min. Después se disolvió la fracción en tampón TE y se remitió al laboratorio de análisis de proteínas del programa de biotecnología de la universidad de Cornell solicitando que se determinara la proporción de los diversos aminoácidos presentes en la proteína y la secuencia de aminoácidos que empezaban desde el extremo N.  
55



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

Gly	Gln	Phe	Met	Asp	Gln	Tyr	Pro	Glu	Val	Phe	Gly	Lys	Pro	Gln
				305					310					315
Tyr	Gln	Lys	Gly	Pro	Gly	Gln	Glu	Val	Lys	Thr	Asp	Asp	Lys	Ser
				320					325					330
Trp	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Lys	Pro	Asp	Asp	Asp	Gly	Met	Thr	Pro
				335					340					345
Ala	Ser	Met	Glu	Gln	Phe	Asn	Lys	Ala	Lys	Gly	Met	Ile	Lys	Arg
				350					355					360
Pro	Met	Ala	Gly	Asp	Thr	Gly	Asn	Gly	Asn	Leu	His	Asp	Ala	Val
				365					370					375
Pro	Val	Val	Leu	Arg	Trp	Val	Leu	Met	Pro					
				380					385					

La secuencia parcial de aminoácidos de harpin se usó para construir una sonda oligonucleotídica cuyas bases se corresponden a las que codifican los noveno a decimoquinto aminoácido de la región N-terminal de harpin. Dado que varios de estos aminoácidos pueden tener varios codones de ácido nucleico, se construyó un oligonucleótido degenerado 48 veces de acuerdo con procedimientos convencionales.

5

En el siguiente ejemplo se describe la identificación de clones que codifican la harpin por hibridación con una sonda oligonucleotídica para harpin.

## EJEMPLO IX

El gen estructural que codifica la harpin se identificó por hibridación de la sonda oligonucleotídica construida en el Ejemplo VIII con ADN de *Erwinia amylovora*. El ADN específico clonado en la agrupación hrp de *E. amylovora* en el cósmido pCPP430 se digirió con la enzima de restricción *Bam*HI y una parte separada se digirió con la enzima de restricción *Hind*III. Los resultados de la digestión de ADN se sometieron a electroforesis en agarosa al 0,7%, se tiñeron con bromuro de etidio, se transfirieron a una membrana de nylon (Immobilon) y se hibridaron con la sonda oligonucleotídica anteriormente descrita, de acuerdo con procedimientos convencionales. La sonda se marcó con fósforo radioactivo usando GTP marcado con <sup>32</sup>P.

10

15

Después de la hibridación y la exposición de las membranas a película de rayos X X-O-Mat (Kodak) y el desarrollo de la película, un fragmento de 1,3 kb *Hind*III proporcionó la señal de hibridación más fuerte como respuesta a la sonda. El fragmento se subclonó en el vector pBluescript M13+ (Stratagene) y se denominó pCPP1084.

En el siguiente ejemplo se describe la producción de anticuerpos anti-harpin de acuerdo con la presente invención:

20

## EJEMPLO X

Se provocaron anticuerpos en conejos como respuesta a inyección con harpin. Se administraron tres inyecciones de harpin altamente purificada (100, 150 y 50 µg, respectivamente) en intervalos de 2-3 semanas. El antisuero se recogió después de 8 semanas, se precipitó IgG con sulfato de amonio y se absorbió previamente con lisado de *E. coli* DH5α(pCPP9) expuesto a ultrasonidos. La especificidad del antisuero se confirmó por reacción en transferencias de Western de harpin purificada por HPLC, como se describe en el Ejemplo VII. No se observó reacción con suero preinmune cuando se hibridaron transferencias de Western que contenían CFPE determinada procedente de DH5α(pCPP430).

25

En el siguiente ejemplo se describe la descripción de hrpN en el sistema de expresión T7 ARN polimerasa/promotor:

## EJEMPLO XI

Para confirmar que el fragmento de *Hind*III de 1,3 kb contiene el gen hrpN completo, el plásmido pGpl-2 [(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 1074 (1985)] y pCPP1084, que contiene el fragmento de *Hind*III de 1,3 kb bajo el control del promotor T7φ10, se transformó, en *E. coli* DH5α o Ea321. Estos dos plásmidos compatibles constituyen el sistema de expresión T7. Las células que contienen tanto pGpl-1 como pCPP1084 se cultivaron en LB con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina a 30°C. Se recogieron doscientos µl de células a DO<sub>620</sub>=0,5 y se lavaron con 5 ml de medio M9 [Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, (1989)]. Finalmente, las células se resuspendieron en 1,0 ml de medio M9 complementado con 0,01% de 18 aminoácidos (sin cistidina ni metionina). Las células se cultivaron con agitación (200 rpm) a 30°C durante 1 hora y después se pasaron a 42°C durante 10 minutos. Se añadió rifampicina (20 mg/ml de solución madre Sigma R350I en metanol) hasta una concentración final de 200 µg/ml. Las células se incubaron a 42°C durante 10 minutos adicionales y después se pasaron a 30°C y se incubaron durante 1 hora más. Las células se

30

35

40

impulsaron con 10  $\mu$ Ci de metionina  $^{35}$ S durante 5 minutos a 30°C. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 50  $\mu$ l “tampón de separación” (Tris-HCl 60 mM, a pH 6,8, SDS al 1%, 2-mercaptoetanol al 1%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,01%). Las muestras se calentaron a 100 °C durante 3 min y 20  $\mu$ l se colocaron en un gel de SDS-PAGE al 10%. Después de someter a electroforesis a 15 mA durante 2,0 h en un aparato Mighty Small™ (de acuerdo con las instrucciones de Hoefer Scientific Instruments), el gel se secó y se expuso a película de rayos X durante 2 horas a temperatura ambiente. Se observó una banda sencilla de 44 kD, cuyo tamaño molecular correspondía al de harpin, en las construcciones de *E. coli* DH5 $\alpha$  y Ea321. La banda de 44 kD expresada procedente de este sistema también reaccionó con anticuerpos anti-harpin provocados en conejos (Ejemplo X). Este experimento demostró que el fragmento *Hind*III de 1,3 kb contiene la fase de lectura abierta completa que codifica la proteína harpin de 44 kD.

La secuencia de ácido nucleico del gen *hrpN* de acuerdo con la presente invención se determinó de acuerdo con el siguiente ejemplo.

EJEMPLO XII

El análisis de secuenciación de ADN se realizó mediante el procedimiento de terminación de la cadena didesoxi (Sanger 1977, PNAS 74: 5643-5667). Se verificaron las secuencias de ambas cadenas usando el cebador universal o el cebador T3. Los subclones generados por Kpn1 y Pt+1 desde el fragmento de *Hind*III de 1,3 kb se usaron directamente como moldes para la secuenciación. La secuencia de nucleótidos de *hrpN* se remitió a Genbank y se le asignó el número de acceso M92994. A continuación se muestra la secuencia de nucleótidos.

20	AAGCTTCGGC ATGGCAOGTT TGACOGTTGG GTCCGCAGGG TACGTTTGAA 50 TTATTCATAA GAGGAATACG TT ATG AGT CTG AAT ACA AGT GGG. 93 CTG GGA GCG TCA ACG ATG CAA ATT TCT ATC GGC GGT GCG GGC 135 GGA AAT AAC GGG TTG CTG GGT ACC AGT CGC CAG AAT GCT GGG 177 TTG GGT GGC AAT TCT GCA CTG GGG CTG GGC GGC GGT AAT CAA 219 AAT GAT ACC GTC AAT CAG CTG GCT GGC TTA CTC ACC GGC ATG 261 ATG ATG ATG ATG AGC ATG ATG GGC GGT GGT GGG CTG ATG GGC 303
----	--

GGT GGC TTA GGC GGT GGC TTA GGT AAT GGC TTG GGT GGC TCA 345  
GGT GGC CTG GGC GAA GGA CTG TCG AAC GCG CTG AAC GAT ATG 387  
TTA GGC GGT TCG CTG AAC ACG CTG GGC TCG AAA GGC GGC AAC 429  
AAT ACC ACT TCA ACA ACA AAT TCC CCG CTG GAC CAG GCG CTG 471  
GGT ATT AAC TCA ACG TCC CAA AAC GAC GAT TCC ACC TCC GGC 513  
ACA GAT TCC ACC TCA GAC TCC AGC GAC CCG ATG CAG CAG CTG 555  
CTG AAG ATG TTC AGC GAG ATA ATG CAA AGC CTG TTT GGT GAT 597  
GGG CAA GAT GGC ACC CAG GGC AGT TCC TCT GGG GGC AAG CAG 639  
COG ACC GAA GGC GAG CAG AAC GCC TAT AAA AAA GGA GTC ACT 681  
GAT GCG CTG TCG GGC CTG ATG GGT AAT GGT CTG AGC CAG CTC 723  
CTT GGC AAC GGG GGA CTG GGA GGT GGT CAG GGC GGT AAT GCT 765  
GGC ACG GGT CTT GAC GGT TCG TCG CTG GGC GGC AAA GGG CTG 807  
CGG GGC CTG AGC GGG CCG GTG GAC TAC CAG CAG TTA GGT AAC 849  
GCC GTG GGT ACC GGT ATC GGT ATG AAA GCG GGC ATT CAG GCG 891  
CTG AAT GAT ATC GGT ACG CAC AGG CAC AGT TCA ACC CGT TCT 933  
TTC GTC AAT AAA GGC GAT CGG GCG ATG GCG AAG GAA ATC GGT 975  
CAG TTC ATG GAC CAG TAT CCT GAG GTG TTT GGC AAG CCG CAG 1017  
TAC CAG AAA GGC CCG GGT CAG GAG GTG AAA ACC GAT GAC AAA 1059  
TCA TGG GCA AAA GCA CTG AGC AAG CCA GAT GAC GAC GGA ATG 1101  
ACA OCA GCC AGT ATG GAG CAG TTC AAC AAA GCC AAG GGC ATG 1143  
ATC AAA AGG CCC ATG GCG GGT GAT ACC GGC AAC GGC AAC CTG 1185  
CAG CAC GCG GTG CCG GTG GTT CTT CGC TGG GTA TTG ATG CCA 1227  
TGA TGGCCGGTGA TGCCATTAAAC AATATGGCAC TTGGCAAGCT 1270  
GGGCGGGCT TAAGCTT 1287

En esta secuencia, la fase de lectura abierta (incluyendo el codón de terminación TGA) que se expresa para proporcionar la secuencia de aminoácidos de harpin es la siguiente:

ATG AGT CTG AAT ACA AGT GGG CTG GGA GCG TCA ACG ATG CAA 42  
ATT TCT ATC GGC GGT GCG GGC GGA AAT AAC GGG TTG CTG GGT 84  
ACC AGT CGC CAG AAT GCT GGG TTG GGT GGC AAT TCT GCA CTG 126  
GGG CTG GGC GGC GGT AAT CAA AAT GAT ACC GTC AAT CAG CTG 168  
GCT GGC TTA CTC ACC GGC ATG ATG ATG ATG ATG AGC ATG ATG 210  
GGC GGT GGT GGG CTG ATG GGC GGT GGC TTA GGC GGT GGC TTA 252  
GGT AAT GGC TTG GGT GGC TCA GGT GGC CTG GGC GAA GGA CTG 294

TCG AAC GCG CTG AAC GAT ATG TTA GGC GGT TCG CTG AAC ACG 336  
 CTG GGC TCG AAA GGC GGC AAC AAT ACC ACT TCA ACA ACA AAT 378  
 TCC CCG CTG GAC CAG GCG CTG GGT ATT AAC TCA ACG TCC CAA 420  
 AAC GAC GAT TCC ACC TCC GGC ACA GAT TCC ACC TCA GAC TCC 462  
 AGC GAC CCG ATG CAG CAG CTG CTG AAG ATG TTC AGC GAG ATA 504  
 ATG CAA AGC CTG TTT GGT GAT GGG CAA GAT GGC ACC CAG GGC 546  
 AGT TCC TCT GGG GGC AAG CAG CCG ACC GAA GGC GAG CAG AAC 588  
 GCC TAT AAA AAA GGA GTC ACT GAT GCG CTG TCG GGC CTG ATG 630  
 GGT AAT GGT CTG AGC CAG CTC CTT GGC AAC GGG GGA CTG GGA 672  
 GGT GGT CAG GGC GGT AAT GCT GGC ACG GGT CTT GAC GGT TCG 714  
 TCG CTG GGC GGC AAA GGG CTG CCG GGC CTG AGC GGG CCG GTG 756  
 GAC TAC CAG CAG TTA GGT AAC GCC GTG GGT ACC GGT ATC GGT 798  
 ATG AAA GCG GGC ATT CAG GCG CTG AAT GAT ATC GGT ACG CAC 840  
 AGG CAC AGT TCA ACC CGT TCT TTC GTC AAT AAA GGC GAT CGG 882  
 GCG ATG GCG AAG GAA ATC GGT CAG TTC ATG GAC CAG TAT CCT 924  
 GAG GTG TTT GGC AAG CCG CAG TAC CAG AAA GGC CCG GGT CAG 966  
 GAG GTG AAA ACC GAT GAC AAA TCA TGG GCA AAA GCA CTG AGC 1008  
 AAG CCA GAT GAC GAC GGA ATG ACA CCA GCC AGT ATG GAG CAG 1050  
 TTC AAC AAA GCC AAG GGC ATG ATC AAA AGG OCC ATG GCG GGT 1092  
 GAT ACC GGC AAC GGC AAC CTG CAG CAC GCG GTG CCG GTG GTT 1134  
 CTT CGC TGG GTA TTG ATG CCA TGA 1158

En el siguiente ejemplo se representa la sobreexpresión del gen *hrpN* para producir grandes cantidades de harpin:

#### EJEMPLO XIII

5 Para la expresión alta de harpin se construyó especialmente un nuevo plásmido, denominado pCPP50, de la siguiente manera:

10 Se modificó el vector de expresión pNIII<sup>113</sup>-A2 [véase Bio/Technology, páginas 81-85 (enero, 1984)]. Se digirió con la endonucleasa de restricción *Xba*I y *Hind*III dando como resultado dos fragmentos. El fragmento de más pequeño de ADN se desechó y se substituyó con una parte de poliengarzador pBluescript SK<sup>-</sup> (*Xba*I a *Hind*III). Estas manipulaciones eliminaron el sitio de unión de ribosomas y el codon de iniciación (ATG) de pNIII<sup>113</sup>-A2 y se substituyó por diversos sitios de clonación útiles (*Xba*I, *Spe*I, *Bam*HI, *Sma*I, *Pst*I, *Eco*RV, *Hind*III, *Bam*HI). Se usó el vector resultante (pCPP50) junto con el gen *hrpN* para facilitar la superproducción de harpin por *E. coli*.

15 El plásmido pCPP1084, que contenía *hrpN* (Ejemplo VII) se digirió con la endonucleasa de restricción *Hind*III. El fragmento de ADN de *Hind*III 1,3 kb se purificó de un gel de agarosa y se ligó con pCPP50 que también se había digerido con *Hind*III y tratado con fosfatasa alcalina. El ADN se transformó en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se exploraron diversos transformantes en un gel de SDS-poliacrilamida para la producción de una proteína que correspondiera a la movilidad conocida de la harpin. Un clon, denominado pCPP2139, produjo grandes cantidades de harpin.

20 De acuerdo con el siguiente procedimiento se produjeron grandes cantidades de harpin en *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP2139): *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP2139) se cultivó en medio mínimo M9 complementado con 5 g/l de ácidos casamino y 40 mg/l de tiamina. Las bacterias se cultivaron durante 20 horas más a 37°C. Harpin se aisló de la bacteria de acuerdo con el Ejemplo III.

La harpin producida por *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP2139) fue activa en ensayos en hoja de tabaco y tenía el mismo peso molecular en geles de SDS-poliacrilamida y reaccionó con antisuero anti-harpin (Ejemplo X) al igual que la harpin producida por *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430).

25 En ensayos de dilución puntual de hoja de tabaco, CFEP producido a partir de *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP2139) tenía una actividad detectable a una dilución de 1:150. *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430) tenía una actividad detectable en una dilución de solo 1:10. Por lo tanto, *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP2139) produjo al menos 15 veces tanta harpin como *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCPP430). Los resultados a los que se hace referencia se incluyen en la siguiente tabla.



TABLA 2

CFEP a partir de cepa de <i>E. coli</i>	Diluciones					
	1:10	1:20	1:50	1:100	1:150	1:200
DH5 $\alpha$ (pCPP2139)	+	+	+	+	+	-
DH5 $\alpha$ (pCPP430)	+	-	-	-	-	-

+ = una reacción positiva, colapso del tejido de tabaco al igual que en la respuesta hipersensible;  
- = una reacción negativa, no hay colapso del tejido de hoja de tabaco

Se extrajeron conclusiones similares examinando geles de SDS-poliacrilamida que contenían preparados de harpin procedentes de las dos construcciones.

- 5 Además de determinar hrpN en *E. amylovora* y debido a que se cree que la harpin es el arquetipo de una familia de inductores protéicos de RH producidos por diversas bacterias fitopatógenas diferentes, también se realizó la identificación de homólogos de hrpN en *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia stewartii* de acuerdo con el siguiente protocolo.

#### Ejemplo XIV

- 10 El fragmento de ADN de *Hind*III 1,3 kb de pCPP1084, que contenía hrpN, se usó como una sonda radiactiva frente a 18 cósmidos que se había demostrado previamente que contenían genes hrp de la cepa AC4150 de *E. chrysanthemi*. Un cósmido, pCPP2157, hibridó fuertemente con el clon HrpN en condiciones muy rigurosas (lavados realizados en 0,4 x SSC, SDS al 0,2%, a 65°C). El cósmido se usó en análisis posteriores. Se clonó un fragmento de Cla1 de 800 pb de pCPP2157, que se había hibridado con la sonda HrpN, en pBluescript SK- para producir pCPP2140. La secuenciación inicial del ADN (usando el kit Sequenase versión 2.0, U. S. Biochemicals) de un extremo del fragmento de Cla1 de 800 presentó una región de 224 nucleótidos con una identidad de nucleótidos del 72%. La comparación de la secuencia se realizó con FASTA, y la secuencia de nucleótidos de *E. chrysanthemi* correspondiente al hrpN de *E. amylovora* (mayor similitud) del nucleótido 1005 al 1223 indica una identidad del 72%. A continuación se proporciona la secuencia de *E. chrysanthemi*:

```

CGGTAACCG GATAACAGAA AGATGGCTGG AGTTCGCCAG AAGACGGACG 50
ACAAATCCTG GGCATAAGCG CTGAGTAAAC CGGATGATGA CCGTATGACC 100
GGTCTGCCAG CATGGACAAA TTCOGTCAGG CGATGGGTAT GATCAAAAGC 150
GCGGTGGCGG GTGATAACCG CAATACCAAC CTGAATCTGC GTGGCGCGGG 200
CGGTCATCG CTGGGIATCG AT 222

```

- 20 Usando un protocolo similar, se usó el fragmento de ADN de *Hind* III de 1,3 kb de pCPP1084 para explorar un ADN de *E. stewartii*. El ADN genómico de la cepa DC283 y el ADN del clon cósmido pES411 [véase Coplin y col., Mol. Plant-Microbe Interactions. 5: 266-268 (1992)] se hidrolizaron con *Hind* III, se sometieron a electroforesis y se hibridaron. Con la sonda se hibridó un fragmento de *Hind* III de 1,8 kb de ambos preparados de ADN. Estos resultados indican que el hrpN de *E. amylovora* comparte homología con un gen parecido a hrpN de *E. stewartii*.
- 25 A continuación se describe el efecto de dos medios de inactivación, de acuerdo con la presente invención, de la enfermedad en plantas de la harpin.

#### EJEMPLO XV

- 30 La inactivación de harpin por reacción de células *E. amylovora* con un antisuero específico para harpin (Ejemplo X) o con una proteasa que degrada la harpin (Ejemplo VII) dio como resultado una reducción en la enfermedad del peral causada por *E. amylovora*. Se desinfectó la superficie de las peras inmaduras, cosechadas cuando el diámetro del fruto tenía un diámetro de 3-4 cm, se cortaron por la mitad longitudinalmente y se colocaron en toallas de papel humedecidas. Con una barrena del número 1 se cortaron pocillos en los lados de la fruta (véase Beer, S.V. Methods in Phytobacteriology, páginas 372-375 (1990) Klement, Z., Rudolf, K, and Sands, D. eds). Se mezcló 1 ml de un cultivo de Ea321 ( $2 \times 10^8$  ufc/ml) con 50  $\mu$ l y 100  $\mu$ l de una dilución de 1:25 de antisuero anti-harpin (Ejemplo X) y después de 5 minutos, se depositaron 50  $\mu$ l de la mezcla en el pocillo de cada pera. De manera similar, se mezclaron suspensiones de Ea321 con proteasa antes de depositarlas en los pocillos de la pera. Las peras se incubaron a 27°C y se observaron diariamente durante 3 días.

Los controles consistieron en células no tratadas y células mezcladas con suero preinmune o extraído del mismo conejo. A continuación se muestran los resultados en la siguiente tabla:

Tratamiento	Infección*
Ea321	8/8
Ea321 + Proteasa (100 µg/ml)	6/8
Ea321 + Proteasa (200 µg/ml)	5/8
Ea321 + Antisuero (50 µg/ml)	5/8
Ea321 + Antisuero (100 µg/ml)	5/8
Ea321 + Suero preinmune (100 µg/ml)	8/8

\*Número de mitades de peras tratadas (de un total de 8) que mostraron exudado en los extremos cortados 64 horas después de la inoculación con 50 µl que contenía  $1 \times 10^8$  ufc de Ea321 tratado como se ha indicado.

5 El tratamiento de *E. amylovora* con proteasa o antisuero específico para harpin redujo el número de peras infectadas. El tratamiento con suero preinmune (normal) no influyó en el desarrollo de la enfermedad. El ensayo descrito anteriormente del efecto de los dos tratamientos que afectan a la harpin sin afectar a la vitalidad o crecimiento de *E. amylovora fue* particularmente riguroso. Solo podía resultar afectada la harpin presente en las células tratadas porque el antisuero o enzima no podía estar presente para reaccionar con la harpin en la progenie de las células tratadas. En condiciones previstas para el uso práctico de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos anti-harpin podrían producirse por plantas transformadas con genes que codifiquen anticuerpos anti-harpin o con proteasa y estos, a su vez, inhibirían o atenuarían la gravedad de la enfermedad de la planta expuesta al inductor. Además, en la naturaleza, el tratamiento de manzanos y perales en flor con proteasa o anticuerpos anti-harpin puede dar como resultado una mayor reducción del fuego bacteriano ya que generalmente las infecciones las inicia un pequeño número de células, en contraposición a aproximadamente  $10^8$ , como se usó en el ejemplo anterior.

15 Por tanto, para resumir la presente invención, existen sólidas pruebas de que la harpin es el arquetipo de factores proteicos que permiten que las bacterias fitopatógenas (y posiblemente otros microorganismos patógenos) induzcan la respuesta hipersensible en no huéspedes o estimulen la enfermedad en huéspedes. Para empezar, cepas de los tres géneros *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* inducen una respuesta hipersensible similar (visual y fisiológicamente) cuando se infiltran en hojas de sus plantas no huéspedes respectivas. Esta relación se ha documentado prácticamente desde el descubrimiento de la respuesta hipersensible inducida por bacterias en 1963. Además, los genes necesarios para inducir la RH por las cepas de los tres géneros de bacterias (denominados en conjunto genes hrp) también son necesarios para la patogenicidad de las plantas huésped y para inducir la respuesta hipersensible en plantas no huésped.

25 La relación entre los genes hrp de las bacterias fitopatógenas se ha documentado en los estudios de Laby y Beer [Molecular Plant Microbe Interactions 5: (1992); R.J. Laby, Molecular studies on pathogenicity and virulence factors of *Erwinia amylovora*, M.S. Thesis, Cornell University, Ithaca, NY 1991]. Estos mostraron relaciones concluyentes, a nivel del ADN, entre el conjunto de genes hrp de *E. amylovora* y el conjunto de genes hrp de *Pseudomonas syringae*, así como la relación entre el conjunto de genes hrp de *E. amylovora* y el conjunto de genes *wts* (empapamiento) de *E. stewartii*. Otros investigadores han demostrado una notable relación entre los genes hrp de diversas patovarietades de *P. syringae* (cepas de *P. syringae* patógenas para plantas específicas y diferentes). Otros investigadores han demostrado una estrecha relación entre los genes hrp de cepas de *Xanthomonas campestris* y de *P. solanacearum*. Por lo tanto, existen pruebas abrumadoras de que el ADN conservado entre bacterias patógenas de plantas de diversos géneros causa enfermedades de multitud de plantas.

30 También se ha demostrado la significativa similitud en la secuencia de ADN entre el gen hrpN de *E. amylovora* y un gen homólogo de *E. chrysanthemi*, de acuerdo con la presente invención. Además, los autores de la invención han observado una fuerte hibridación entre hrpN y el ADN genómico de *E. stewartii*, un patógeno grave para el maíz. Más específicamente, se observó hibridación entre hrpN y un fragmento de *HindIII* de 1,8 kb específico del conjunto de genes *wts*. Esto indica que las otras dos especies de *Erwinia* examinadas hasta ahora tienen homólogos hrpN. Por tanto, puede esperarse una similitud significativa en los productos de genes parecidos a hrpN (proteína) de acuerdo con la presente invención.

40 Además, muchos de los genes hrp de *E. amylovora* parecen estar implicados en la secreción de la exposición de harpin en la superficie celular, en base al fenotipo de las mutaciones en estos genes. Un gen del conjunto de genes hrp de *Pseudomonas syringae*, que se hibrida con una parte del conjunto de genes hrp de *E. amylovora*, codifica una proteína con una elevada similitud de aminoácidos con proteínas implicadas en la secreción en diversas bacterias Gram negativas.

Por tanto, las similitudes conocidas de los genes hrp de *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Erwinia* proporcionan una base firme para sospechar que los inductores de RH producidos por cepas de los tres géneros pueden tener una secuencia de aminoácidos similar o al menos en cuanto a sus características generales (proteína) y función.

5 Los usos a los que se destinan los diversos aspectos y partes de la presente invención son muchos y variados. Por ejemplo, pueden usarse mutantes de hrpN para identificar, por complementación, genes de otros organismos fitopatógenos (por ejemplo, bacterias, hongos, nematodos) que codifican proteínas que funcionan de manera similar a la harpin. Aunque dichas proteínas pueden tener estructuras primarias sustancialmente diferentes (y por lo tanto serían difíciles de detectar mediante técnicas de hibridación de ADN), estas proteínas deberían restablecer la capacidad para inducir la RH a células de *E. amylovora* o *E. coli* que poseen un grupo hrp que fuese funcional, exceptuando el gen hrpN.

10 Otro uso es usar la harpin y/o cepas productoras de harpin para identificar en las plantas receptores de harpin y/o sus interacciones en rutas de transducción de señales y para clonar sus genes codificantes. Por tanto, esto permitiría aprovechar el potencial de harpin para funcionar (dependiendo de la planta) como un factor de patogenicidad o como un inductor de reacciones de defensa para manipular la estructura o expresión de gen(es) de plantas que codifican receptor(es) con objeto de producir plantas modificadas por ingeniería genética con resistencia mejorada a fitopatógenos.

Otro uso de la harpin sería como un potenciador de la producción de un metabolito secundario en plantas cultivadas de forma natural o en cultivo de tejido.

20 Otro uso sería la fusión del gen que codifica a la harpin con promotores específicos de genes de plantas para desarrollar plantas transgénicas específicas. Cuando el gen de la planta "se activa", la harpin se expresaría y se destruirían las células de la planta. Algunos promotores de genes de plantas apropiados y sus usos proyectados incluyen genes implicados en el desarrollo del polen (lo que daría como resultado el desarrollo de plantas androestériles); genes que se expresan en respuesta a una infección por hongos, por ejemplo genes que codifican fenilalanina amonio liasa y chalcona sintasa (la célula de la planta se destruiría limitando de ese modo el progreso del hongo y haciendo que la planta sea resistente a las enfermedades fúngicas) y genes implicados en el desarrollo de senescencia (para facilitar la cosecha, la expresión de genes hrp tendría como resultado la defoliación).

Otro uso más de la harpin sería el uso de la harpin como una "molécula diana" con la que reaccionarían compuestos químicos diseñados para ello, inactivando así la harpin bacteriana, lo cual, debido a que es esencial para la enfermedad, proporcionaría una diana bactericida específica.

30 A continuación se describe una lista de nucleótidos y aminoácidos descritos en la presente solicitud:

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Zhong-Min Wei, David W. Bauer, Steven V. Beer, Alan Collmer, Sheng-Yang He, and Ron J. Laby

35 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Inductor de la Respuesta Hipersensible en Plantas

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

40 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENAS: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 1:

**Met Ser Leu Asn Thr Ser Gly Leu Gly Ala Ser Thr Met Gln Ile**

45 **5 10 15**

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

## (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 385 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENAS: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

## (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

## (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 2:

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

Asn	Ala	Tyr	Lys	Lys	Gly	Val	Thr	Asp	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Met
				200					205					210
Gly	Asn	Gly	Leu	Ser	Gln	Leu	Leu	Gly	Asn	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly
				215					220					225
Gly	Gln	Gly	Gly	Asn	Ala	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Leu
				230					235					240
Gly	Gly	Lys	Gly	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Gly	Pro	Val	Asp	Tyr	Gln
				245					250					255
Gln	Leu	Gly	Asn	Ala	Val	Gly	Thr	Gly	Ile	Gly	Met	Lys	Ala	Gly
				260					265					270
Ile	Gln	Ala	Leu	Asn	Asp	Ile	Gly	Thr	His	Arg	His	Ser	Ser	Thr
				275					280					285
Arg	Ser	Phe	Val	Asn	Lys	Gly	Asp	Arg	Ala	Met	Ala	Lys	Glu	Ile
				290					295					300
Gly	Gln	Phe	Met	Asp	Gln	Tyr	Pro	Glu	Val	Phe	Gly	Lys	Pro	Gln
				305					310					315
Tyr	Gln	Lys	Gly	Pro	Gly	Gln	Glu	Val	Lys	Thr	Asp	Asp	Lys	Ser
				320					325					330
Trp	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Lys	Pro	Asp	Asp	Asp	Gly	Met	Thr	Pro
				335					340					345
Ala	Ser	Met	Glu	Gln	Phe	Asn	Lys	Ala	Lys	Gly	Met	Ile	Lys	Arg
				350					355					360
Pro	Met	Ala	Gly	Asp	Thr	Gly	Asn	Gly	Asn	Leu	His	Asp	Ala	Val
				365					370					375
Pro	Val	Val	Leu	Arg	Trp	Val	Leu	Met	Pro					
				380					385					

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1287 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENAS: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 3:

```

AAGCTTCGGC ATGGCACGTT TGACCGTIGG GTCGGCAGGG TACGTTTGAA    50
TTATTCATAA GAGGAATACG TT ATG AGT CTG AAT ACA AGT GGG    93
CTG GGA GCG TCA ACG ATG CAA ATT TCT ATC GGC GGT GCG GGC   135
GGA AAT AAC GGG TTG CTG GGT ACC AGT CGC CAG AAT GCT GGG   177
    
```

5

10

TTG GGT GGC AAT TCT GCA CTG GGG CTG GGC GGC GGT AAT CAA 219  
 AAT GAT ACC GTC AAT CAG CTG GCT GGC TTA CTC ACC GGC ATG 261  
 ATG ATG ATG ATG AGC ATG ATG GGC GGT GGT GGG CTG ATG GCC 303  
 GGT GGC TTA GGC GGT GGC TTA GGT AAT GGC TTG GGT GGC TCA 345  
 GGT GGC CTG GGC GAA GGA CTG TOG AAC GOG CTG AAC GAT ATG 387  
 TTA GGC GGT TCG CTG AAC ACG CTG GGC TOG AAA GGC GGC AAC 429  
 AAT ACC AAT TCA ACA ACA AAT TCC CCG CTG GAC CAG GOG CTG 471  
 GGT ATT AAC TCA ACG TCC CAA AAC GAC GAT TCC ACC TCC GGC 513  
 ACA GAT TCC ACC TCA GAC TCC AGC GAC COG ATG CAG CAG CTG 555  
 CTG AAG ATG TTC AGC GAG ATA ATG CAA AGC CTG TTT GGT GAT 597  
 GGG CAA GAT GGC AOC CAG GGC AGT TCC TCT GGG GGC AAG CAG 639  
 CCG ACC GAA GGC GAG CAG AAC GCC TAT AAA AAA GGA GTC ACT 681  
 GAT GCG CTG TCG GGC CTG ATG GGT AAT GGT CTG AGC CAG CTC 723  
 CTT GGC AAC GGG GGA CTG GGA GGT GGT CAG GGC GGT AAT GCT 765  
 GGC ACG GGT CTT GAC GGT TCG TOG CTG GGC GGC AAA GGG CTG 807  
 CGG GGC CTG AGC GGG CCG GTG GAC TAC CAG CAG TTA GGT AAC 849  
 GCC GTG GGT ACC GGT ATC GGT ATG AAA GCG GGC ATT CAG GCG 891  
 CTG AAT GAT ATC GGT ACG CAC AGG CAC AGT TCA ACC CGT TCT 933  
 TTC GTC AAT AAA GGC GAT CGG GCG ATG GCG AAG GAA ATC GGT 975  
 CAG TTC ATG GAC CAG TAT CCT GAG GTG TTT GGC AAG CCG CAG 1017  
 TAC CAG AAA GGC CCG GGT CAG GAG GTG AAA ACC GAT GAC AAA 1059  
 TCA TGG GCA AAA GCA CTG AGC AAG CCA GAT GAC GAC GGA ATG 1101  
 ACA CCA GCC AGT ATG GAG CAG TTC AAC AAA GCC AAG GGC ATG 1143  
 ATC AAA AGG OCC ATG GCG GGT GAT ACC GGC AAC GGC AAC CTG 1185  
 CAG CAC GCG GTG CCG GTG GTT CTT CGC TGG GTA TTG ATG CCA 1227  
 TGA TGGCCGGTGA TGCCATTAAAC AATAITGGCAC TTGGCAAGCT 1270  
 GGGCGGGCT TAAGCTT 1287

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1158 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 4:

ATG AGT CTG AAT ACA AGT GGG CTG GGA GCG TCA ACG ATG CAA 42  
 ATT TCT ATC GGC GGT GCG GGC GGA AAT AAC GGG TTG CTG GGT 84  
 ACC AGT CGC CAG AAT GCT GGG TTG GGT GGC AAT TCT GCA CTG 126  
 GGG CTG GGC GGC GGT AAT CAA AAT GAT ACC GTC AAT CAG CTG 168  
 GCT GGC TTA CTC ACC GGC ATG ATG ATG ATG ATG AGC ATG ATG 210  
 GGC GGT GGT GGG CTG ATG GGC GGT GGC TTA GGC GGT GGC TTA 252  
 GGT AAT GGC TTG GGT GGC TCA GGT GGC CTG GGC GAA GGA CTG 294  
 TCG AAC GCG CTG AAC GAT ATG TTA GGC GGT TCG CTG AAC ACG 336  
 CTG GGC TCG AAA GGC GGC AAC AAT ACC ACT TCA ACA ACA AAT 378  
 TCC CCG CTG GAC CAG GCG CTG GGT ATT AAC TCA ACG TCC CAA 420  
 AAC GAC GAT TCC ACC TCC GGC ACA GAT TCC ACC TCA GAC TCC 462  
 AGC GAC CCG ATG CAG CAG CTG CTG AAG ATG TTC AGC GAG ATA 504  
 ATG CAA AGC CTG TTT GGT GAT GGG CAA GAT GGC ACC CAG GGC 546  
 AGT TCC TCT GGG GGC AAG CAG CCG ACC GAA GGC GAG CAG AAC 588  
 GCC TAT AAA AAA GGA GTC ACT GAT GCG CTG TCG GGC CTG ATG 630  
 GGT AAT GGT CTG AGC CAG CTC CTT GGC AAC GGG GGA CTG GGA 672  
 GGT GGT CAG GGC GGT AAT GCT GGC ACG GGT CTT GAC GGT TCG 714  
 TCG CTG GGC GGC AAA GGG CTG CCG GGC CTG AGC GGG CCG GTG 756  
 GAC TAC CAG CAG TTA GGT AAC GCC GTG GGT ACC GGT ATC GGT 798  
 ATG AAA GCG GGC ATT CAG GCG CTG AAT GAT ATC GGT ACG CAC 840  
 AGG CAC AGT TCA ACC CGT TCT TTC GTC AAT AAA GGC GAT CCG 882  
 GCG ATG GCG AAG GAA ATC GGT CAG TTC ATG GAC CAG TAT CCT 924  
 GAG GTG TTT GGC AAG CCG CAG TAC CAG AAA GGC CCG GGT CAG 966  
 GAG GTG AAA ACC GAT GAC AAA TCA TGG GCA AAA GCA CTG AGC 1008  
 AAG OCA GAT GAC GAC GGA ATG ACA CCA GCC AGT ATG GAG CAG 1050  
 TTC AAC AAA GCC AAG GGC ATG ATC AAA AGG CCC ATG GCG GGT 1092  
 GAT ACC GGC AAC GGC AAC CTG CAG CAC GCG GTG CCG GTG GTT 1134  
 CTT CGC TGG GTA TTG ATG OCA TGA 1158

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 222 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 5:

5

10

OGGTAAACCG GATACCAGAA AGATGGCTGG AGTTGGCCAG AAGACGGACG 50  
 ACAATCTCTG GGCTAAAGCG CTGAGTAAAC CGGATGATGA CGGTATCACC 100  
 GGCTGGCCAG CATGGACAAA TTCCGTCAGG CGATGGGTAT GATCAAAAGC 150  
 GGGTGGGGG GTGATAOCCG CAATAOCCAC CIGAATCTGC GTGGCGGGG 200  
 OGGTGCATCG CTGGGTATCG AT 222

Por lo tanto, aunque los autores de la invención han ilustrado y descrito la realización preferida de la presente invención, debe entenderse que la presente invención puede variarse y modificarse, y por lo tanto, no es deseo de los autores de la invención limitarse a los términos precisados, sino que desean validar dichos cambios y modificaciones que pudieran realizarse para adaptar la invención a diversos usos y condiciones sin alejarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Dichas variaciones y modificaciones, por ejemplo, incluirían la sustitución de secuencias estructuralmente similares, tanto del inductor como de los genes hrpN proporcionados en el presente documento (tanto derivados de fuentes naturales como fabricados sintéticamente) que funcionan para obtener actividades sustancialmente similares a las específicamente descritas anteriormente. Por tanto, se consideran cambios en la secuencia por la sustitución, delección, inserción o adición de ácidos nucleicos (en las secuencias de ADN) o aminoácidos (en las secuencias de péptidos) que no modifiquen sustancialmente la función de estas secuencias específicamente descritas anteriormente. Por consiguiente, dichos cambios y modificaciones se destinan adecuadamente a incluirse dentro del intervalo completo de equivalentes y por lo tanto dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

De este modo se ha descrito el modo y proceso de la invención para realizarla y usarla con los términos completos, claros, concisos y exactos para permitir, a cualquier experto en la materia a la que pertenezca, o que esté relacionada, realizarla y usarla.



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una molécula de ADN aislada que codifica un polipéptido que induce una respuesta hipersensible en diferentes especies de plantas cuando dicho polipéptido es introducido en el tejido de una planta, en el que el polipéptido que induce la respuesta hipersensible procede del patógeno *Erwinia*, comprendiendo dicha molécula de ADN una secuencia de ácido nucleico que puede hibridarse, en condiciones rigurosas de lavado de 0,4 x SSG, SDS al 0,2% a 65°C, con un fragmento de *HindIII* de 1,3 kb presente en el plásmido pCPP1084 de la ATCC con el número de depósito 69021.
- 10 2. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la molécula de ADN que codifica el polipéptido puede inducir una respuesta hipersensible en diferentes especies de plantas cuando dicho polipéptido es introducido en el tejido de la hoja de una planta en condiciones de crecimiento normales.
3. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido codificado corresponde a un inductor de respuesta hipersensible de un patógeno *Erwinia*, *Pseudomonas* o *Xanthomonas*.
- 15 4. La molécula de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido codificado se **caracteriza por** una capacidad de inducir una respuesta hipersensible en tejidos de plantas, estabilidad térmica, un alto contenido en glicinas y sustancialmente sin cisteína.
5. Un gen aislado que comprende la molécula de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Una célula huésped que tiene un vector que comprende la molécula de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
7. Un polipéptido aislado codificado por la molécula de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 20 8. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el polipéptido está purificado o es recombinante.

FIGURA 1

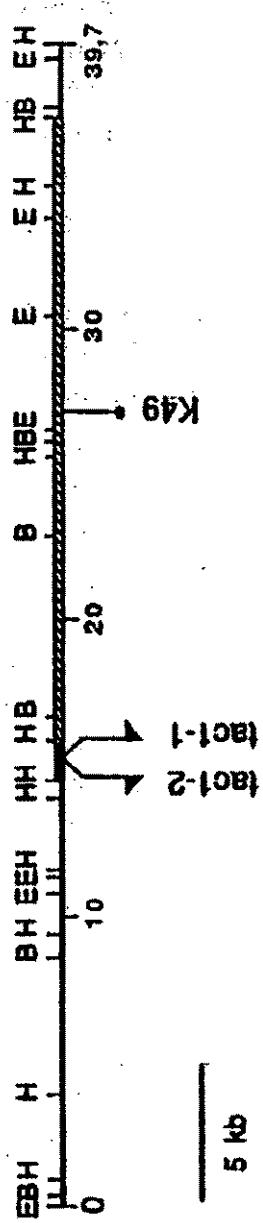


FIGURA 2

