

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 261**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06757079 .6**
96 Fecha de presentación: **06.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1921145**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2008**

54 Título: **GEN PI21 DE SUSCEPTIBILIDAD AL AÑUBLO DEL ARROZ Y USO DEL MISMO.**

30 Prioridad:
28.06.2005 JP 2005187867

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2011

73 Titular/es:
**NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL
SCIENCES
2-1-2, KANNONDAI
TSUKUBA-SHI, IBARAKI-KEN 305-8, JP**

72 Inventor/es:
**FUKUOKA, Shuichi;
OKUNO, Kazutoshi y
KAWASE, Makoto**

74 Agente: **Miltenyi null, Peter**

ES 2 369 261 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

Gen Pi21 de susceptibilidad al añublo del arroz y uso del mismo.

Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a pi21, un gen que confiere al arroz resistencia de campo al añublo, y a métodos para modificar la resistencia de campo al añublo en plantas usando el gen.

Técnica anterior

10 La resistencia del arroz a los hongos del añublo se clasifica en dos tipos: resistencia verdadera y resistencia de campo (documento no de patente 1). Lo anterior se basa en reacciones de hipersensibilidad, y es una resistencia muy eficaz y cualitativa altamente específica para la raza. Se sabe por experiencia que una variedad a la que se ha introducido un único gen de resistencia pierde su efecto en pocos años debido a la aparición de hongos compatibles con el gen. Por otro lado, la resistencia de campo se define como la diferencia de resistencia entre variedades que se observa en condiciones en las que no está funcionando una resistencia verdadera. Aunque el efecto de resistencia de campo es menor en comparación con la resistencia verdadera, es útil de manera práctica porque tiene baja especificidad de raza y puede conferir resistencia continua a variedades.

15 Se conocen treinta o más clases de genes asociados con resistencia verdadera, y de éstos, se han aislado los genes Pib y Pita (documento no de patente 2). Se ha descubierto que estos genes son genes de la clase NBS-LRR que tienen sitios de unión a nucleótidos (NBS) y repeticiones ricas en leucina (LRR), con estructuras similares a los genes de resistencia a enfermedades de plantas notificados anteriormente. Como otros genes de resistencia a enfermedades, se considera que los productos de genes de resistencia de plantas tienen una función receptora, reconociendo directa o indirectamente productos de genes no patógenos en patógenos correspondientes a las enfermedades. En realidad, se ha revelado que Pita se une física y directamente a un producto génico no patógeno.

20 En cuanto a la resistencia de campo, se conocen variedades de arroz de secano japonesas que tienen rasgos excelentes, y se han identificado las posiciones cromosómicas de múltiples loci génicos implicados en la resistencia de campo (documento no de patente 3). Sin embargo, no se han elucidado la estructura y los mecanismos de expresión de los genes, y por tanto, no puede usarse aún de manera eficaz la resistencia de campo para la selección de razas en comparación con la resistencia verdadera. Se ha notificado que múltiples regiones cromosómicas en la variedad de arroz de secano de África Occidental, *Moroberekan*, desempeñan un papel en la resistencia incompleta, que es un concepto similar a la resistencia de campo (documento no de patente 4); sin embargo, no se han identificado genes.

30 [Documento de patente 1] JP2000093028

[Documento de patente 2] JP2000342262

[Documento de patente 3] JP11299488

[Documento de patente 4] JP2003088379

[Documento de patente 5] JP2003199577

35 [Documento de patente 6] JP2003199448

[Documento de patente 7] JP2004329215

[Documento no de patente 1] Rice Blast and Breeding for its resistance. Kousaka y Yamazaki eds., págs. 175-186, 1980, Hakuyusha

[Documento no de patente 2] Wang *et al.*, Plant J 19:55-64, 1999; Bryan *et al.* Plant Cell. 12: 2033-46, 2000

40 [Documento no de patente 3] Fukuoka y Okuno, Theor Appl Genet. 03:185-190, 2001

[Documento no de patente 4] Wang *et al.*, Genet 136:1421-1434, 1994

Descripción de la invención

[Problemas que va a resolver la invención]

45 La presente invención se logró en tales circunstancias. Los problemas que va a resolver la presente invención son aislar e identificar genes implicados en la resistencia de campo al añublo mediante clonación basada en mapa, y proporcionar métodos para modificar resistencia de campo al añublo en plantas usando los genes.

[Medios para resolver los problemas]

Se describen genes que controlan la resistencia al añublo en plantas. Se sabía que el alelo pi21 del gen Pi21 confería al arroz (*Oryza sativa* L.) resistencia de campo al añublo y que existía en alguna posición en la amplia región del cromosoma 4 del arroz. Los presentes inventores tenían como objetivo elucidar la región de existencia y aislar el gen como un único gen.

5 En primer lugar, los presentes inventores realizaron un análisis de ligamiento detallado de la región de pi21 usando una población de segregación a gran escala indispensable para la clonación basada en mapa, para crear un mapa genético de la región de pi21. Los inventores obtuvieron una población de retrocruzamiento realizando de manera continua el retrocruzamiento de una variedad de arroz con cáscara, *Nipponbare* o *Aichi Asahi*, que comprende un alelo de susceptibilidad Pi21 que no suprime la progresión de manchas, con una variedad de arroz de secano japonesa, *Owarihatamochi*, que comprende un alelo de resistencia pi21 que suprime la progresión de manchas. Cuando se realizó un análisis de ligamiento con marcadores de RFLP para la población de retrocruzamiento obtenida, se confirmó que el locus del gen pi21 está ubicado entre los marcadores de RFLP G271 y G317.

15 A continuación, usando los marcadores de RFLP RA3591 y 13S1, que están ubicados a cada lado del locus de pi21, los presentes inventores seleccionaron organismos con recombinación cromosómica cerca del locus de pi21 para crear un mapa genético más preciso de la región de pi21. Los presentes inventores también seleccionaron organismos con recombinación cromosómica cerca del locus de pi21, buscando una población F2 obtenida mediante el cruzamiento de una línea que tiene el alelo de resistencia de *Owarihatamochi* con una línea que tiene el contexto genético de una variedad de arroz con cáscara japonesa y el alelo de susceptibilidad de la variedad de arroz con cáscara india, *Kasalath*. Como resultado de crear un mapa de ligamiento detallado usando estos organismos y los marcadores de ADN producidos, el locus del gen pi21 resultó estar ubicado en la región genómica de aproximadamente 25 kb intercalada entre el marcador de SSCP Pa102484 y el marcador de SNP P702D3_#12. Además, se determinó la secuencia de nucleótidos de clon de PAC P702D03 que se consideró que incluía el gen pi21. Además, analizando la secuencia de nucleótidos de la región genómica candidata de 25 kb en la variedad resistente *Owarihatamochi* y las variedades de susceptibilidad *Aichi Asahi* y *Kasalath*, se descubrió que el gen pi21 está ubicado en la región genómica de aproximadamente 1,8 kb intercalada entre los marcadores de SNP P702D03_#38 y P702D03_#80.

Por tanto, los presentes inventores diseñaron cebadores que podían amplificar una parte correspondiente usando la información de la secuencia de nucleótidos ya obtenida de *Nipponbare*, y luego compararon las secuencias de nucleótidos de los productos genómicos de PCR y RT-PCR entre las variedades de susceptibilidad *Nipponbare* y *Aichi Asahi* y la variedad resistente *Owarihatamochi*. Como resultado, se descubrió que existen dos mutaciones de ADN en la región de exón del gen en la variedad resistente en comparación con las variedades de susceptibilidad. Se demostró que a diferencia de las variedades de susceptibilidad, la variedad resistente tiene delecciones de 7 aminoácidos y 16 aminoácidos, y que estas mutaciones se relacionan con la progresión de manchas producida por la infección de añublo. Es decir, el gen pi21 controla la resistencia al añublo de la planta. Se proporcionan además:

35 [1] un ADN de uno cualquiera de los siguientes (a) a (h):

(a) un ADN que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ó 22,

(b) un ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 20, ó 21,

40 (c) un ADN que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ó 22, y que tiene una función equivalente a la de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ó 22,

45 (d) un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 20 ó 21, y que codifica una proteína que tiene una función equivalente a la de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ó 22,

(e) un ADN que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6,

(f) un ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 ó 5,

50 (g) un ADN que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y que tiene una función equivalente a la de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y

(h) un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 ó 5, y que codifica una proteína que tiene una función equivalente a la de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

55 [2] un ADN de uno cualquiera de los siguientes (i) a (iv), que tiene capacidad para conferir a las plantas resistencia de campo al añublo:

- (i) un ADN que codifica un ARN complementario a un producto de transcripción del ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1],
- (ii) un ADN que codifica un ARN que tiene la actividad ribozima para escindir específicamente un producto de transcripción del ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1],
- 5 (iii) un ADN que codifica un ARN que inhibe la expresión del ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1] mediante un efecto de cosupresión, y
- (iv) un ADN que codifica un ARN que tiene actividad iARN para escindir específicamente un producto de transcripción del ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1];
- 10 [3] el ADN de [2], en el que la planta es arroz, trigo, cebada, avena, maíz, lágrimas de Job, ballico italiano, ballico perenne, fleo, festuca de los prados, mijo, panizo o caña de azúcar;
- [4] un vector que comprende el ADN de uno cualquiera de [1] a [3];
- [5] una célula transformada que mantiene el ADN de uno cualquiera de [1] a [3] en un estado expresable;
- [6] una célula vegetal transformada en la que se ha introducido ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1];
- [7] una célula vegetal transformada en la que se ha introducido ADN de [2] o [3];
- 15 [8] la célula vegetal transformada de [6] o [7], en la que la planta es arroz, trigo, cebada, avena, maíz, lágrimas de Job, ballico italiano, ballico perenne, fleo, festuca de los prados, mijo, panizo o caña de azúcar;
- [9] una planta transformada que comprende la célula transformada de uno cualquiera de [6] a [8];
- [10] una planta transformada que es una progenie o clon de la planta transformada de [8];
- [11] un material de propagación de la planta transformada de [9] o [10];
- 20 [12] un método para producir la planta transformada de [9] o [10], que comprende la etapa de introducir en una célula vegetal el ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1] o el ADN de [2] o [3], y luego regenerar una planta a partir de la célula vegetal;
- [13] un método para conferir a una planta resistencia de campo al añublo, que comprende la etapa de expresar el ADN de [2] o [3] en una célula de la planta;
- 25 [14] el método de [13], en el que la planta es arroz, trigo, cebada, avena, maíz, lágrimas de Job, ballico italiano, ballico perenne, fleo, festuca de los prados, mijo, panizo o caña de azúcar;
- [15] una proteína codificada por el ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1];
- [16] un método para producir la proteína de [15], que comprende la etapa de cultivar una célula transformada que comprende un vector que comprende el ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1], y luego recoger una proteína recombinante de la célula o su sobrenadante de cultivo;
- 30 [17] un anticuerpo que se une a la proteína de [15];
- [18] un ADN que comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos complementarios al ADN de [1] o una secuencia complementaria del mismo;
- [19] un agente que aumenta la resistencia de campo al añublo en una planta, que comprende uno cualquiera del ADN de [2] o [3] o el vector que comprende el ADN;
- 35 [20] un conjunto de cebadores que amplifica la totalidad o una parte de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 4 ó 20;
- [21] un conjunto de cebadores, que es al menos uno cualquiera de los siguientes (a) a (c):
- 40 (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8, y un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9,
- (b) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16, y un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17, y
- (c) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26, y un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27;

[22] un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7, 10, 18, 19, 23 ó 25;

[23] un método que comprende las siguientes etapas (a) a (c):

(a) preparar una muestra de ADN a partir de una planta de prueba,

(b) amplificar la región de ADN descrita en [1] a partir de la muestra de ADN, y

5 (c) comparar el peso molecular o la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado con el/la del ADN de (e) o (f) en [1],

que es un método que evalúa si la planta de prueba tiene resistencia de campo al añublo cuando el peso molecular o la secuencia de nucleótidos concuerda con el/la del ADN de (e) o (f) en [1];

[24] un método que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

10 (a) preparar una muestra de ADN a partir de una planta de prueba,

(b) amplificar la región de ADN descrita en [1] a partir de la muestra de ADN,

(c) separar el ADN bicatenario amplificado en un gel no desnaturalizante, y

(d) comparar la movilidad del ADN bicatenario separado en el gel con la del ADN de (e) o (f) en [1],

15 que es un método que evalúa si la planta de prueba tiene resistencia de campo al añublo cuando la movilidad en el gel concuerda con la del ADN de (e) o (f) en [1];

[25] un método que comprende las siguientes etapas (a) a (e):

(a) preparar una muestra de ADN a partir de una planta de prueba,

(b) amplificar la región de ADN descrita en [1] a partir de la muestra de ADN,

(c) disociar el ADN amplificado en ADN monocatenarios,

20 (d) separar los ADN monocatenarios disociados en un gel no desnaturalizante, y

(e) comparar la movilidad de los ADN monocatenarios separados en el gel con la del ADN de (e) o (f) en [1],

que es un método que evalúa si la planta de prueba tiene resistencia de campo al añublo cuando la movilidad en el gel concuerda con el ADN de (e) o (f) en [1];

[26] un método que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

25 (a) preparar una muestra de ADN a partir de una planta de prueba,

(b) amplificar la región de ADN descrita en [1] a partir de la muestra de ADN,

(c) separar el ADN amplificado en un gel con una concentración creciente gradualmente de un ADN desnaturalizante, y

(d) comparar la movilidad del ADN separado en el gel, con la del ADN de (e) o (f) en [1],

30 que es el método que evalúa si la planta de prueba tiene resistencia de campo al añublo cuando la movilidad en el gel concuerda con la del ADN de (e) o (f) en [1];

[27] un método para seleccionar una planta que tiene resistencia de campo al añublo, que comprende las siguientes etapas (a) y (b):

35 (a) producir una variedad híbrida mediante el cruzamiento de una planta que tiene resistencia de campo al añublo con una planta que tiene una función arbitraria, y

(b) evaluar si la planta producida en la etapa (a) tiene resistencia de campo al añublo mediante el método de uno cualquiera de [23] a [26];

40 [28] un método para evaluar si una planta de arroz de prueba tiene resistencia de campo al añublo cuando un marcador molecular ligado al ADN de [1] muestra el mismo genotipo que en una planta de arroz que tiene resistencia de campo al añublo;

[29] el método de [28], en el que el marcador molecular comprende el ADN de SEQ ID NO: 10;

[30] un método para seleccionar una planta de arroz que tiene resistencia de campo al añublo, comprendiendo el método las siguientes etapas (a) y (b):

(a) producir una variedad híbrida mediante el cruzamiento de una planta de arroz que tiene resistencia de campo al añublo con una planta de arroz que tiene una función arbitraria, y

5 (b) evaluar si la planta de arroz producida en la etapa (a) tiene resistencia de campo al añublo usando el método de [28] o [29];

[31] un método de identificación de un agente que previene o mejora el añublo en una planta, comprendiendo el método las siguientes etapas (a) a (c):

10 (a) poner en contacto un compuesto de prueba con un producto de transcripción del ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1],

(b) detectar la unión del producto de transcripción del ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1] al compuesto de prueba, y

(c) seleccionar un compuesto de prueba que se une al producto de transcripción del ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1];

15 [32] un método de identificación de un agente que previene o mejora el añublo en una planta, comprendiendo el método las siguientes etapas (a) a (c):

(a) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula recogida de una planta,

(b) medir el nivel de expresión de un producto de transcripción del ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1], y

20 (c) seleccionar un compuesto de prueba que disminuye el nivel de expresión del producto de transcripción en comparación con cuando no se pone en contacto con el compuesto de prueba;

[33] un método de identificación de un agente que previene o mejora el añublo en una planta, que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

25 (a) proporcionar una célula o extracto celular que comprende un ADN en el que un gen indicador está unido operativamente en el sentido de 3' de una región promotora del ADN de uno cualquiera de (a) a (d) en [1],

(b) poner en contacto un compuesto de prueba con la célula o extracto celular,

(c) medir el nivel de expresión del gen indicador en la célula o extracto celular, y

(d) seleccionar un compuesto de prueba que disminuye el nivel de expresión del gen indicador en comparación con cuando no se pone en contacto con el compuesto de prueba;

30 [34] un método de examen para determinar un agente que previene o mejora el añublo en una planta, que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

(a) regenerar una planta transformada a partir de la célula vegetal transformada de [6],

(b) poner en contacto el hongo del añublo y un compuesto de prueba con la planta transformada, y

35 (c) seleccionar un compuesto de prueba que suprime el añublo en la planta transformada en comparación con cuando no se pone en contacto con el compuesto de prueba; y

[35] un kit para su uso en el método de identificación de uno cualquiera de [31] a [34].

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra fotografías que indican manchas de añublo en la línea AA-pi21 que tiene el gen pi21 con el contexto genético de *Aichi Asahi* (izquierda), y las de *Aichi Asahi* (derecha).

40 La figura 2 muestra mapas de ligamiento detallados de la región del gen pi21, y un mapa de alineación de clones genómicos. Las figuras 2A y 2B muestran los mapas genéticos creados usando poblaciones de segregación de 72 muestras y 1014 muestras. La figura 2C muestra el mapa de alineación con clones de PAC de *Nipponbare*. La figura 2D muestra un mapa genético detallado de la región del gen pi21, e indica una región genómica candidata.

45 La figura 3 muestra una estructura de un gen candidato a pi21, y una comparación entre secuencias de nucleótidos genómicas de *Nipponbare* y *Aichi Asahi* y la de *Owarihatamochi*.

La figura 4 muestra fotografías que indican manchas que aparecieron en los transformantes de la línea resistente AApi21 en la que se introdujo el gen Pi21 de *Nipponbare*. A: se introdujo el vector solo. B: se introdujo una copia del gen Pi21. C: se introdujeron tres o más copias del gen Pi21.

[Mejor modo de llevar a cabo la invención]

5 Hasta ahora se sabía que el gen pi21, un alelo del gen de susceptibilidad Pi21 que no suprime la progresión del añublo del arroz, está ubicado en algún lugar de la amplia región del cromosoma 4 del arroz, como un gen que confiere al arroz resistencia de campo al añublo. Usando la técnica de clonación basada en mapa, los presentes inventores estrecharon la región del gen pi21 en el cromosoma 4 del arroz, y finalmente tuvieron éxito en su identificación como un único gen. Además, también tuvieron éxito en el aislamiento del gen Pi21, un alelo del gen pi21.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “añublo” significa la alteración del color o la necrotización de una planta, o parte de una planta infectada con un hongo del añublo, o una característica patológica (mancha) reconocida de ese modo. Las manchas del añublo aparecen en todas las partes de la planta, y el añublo se denomina añublo de las plántulas, añublo de las hojas, añublo de las panículas, añublo de las espiguillas, añublo de los nudos, y añublo de los nudos de hojas (lígulas) y otros, según la parte en la que aparecen las manchas. “Añublo” en la presente invención incluye añublo que se produce en cualquiera de estas partes. Un “hongo del añublo del arroz” que produce añublo en arroz se denomina *Magnaporthe grisea* o *Magnaporthe oryzae*, aunque no hay un nombre científico unificado en la actualidad. Además, el hongo del añublo tiene un nombre en estado teleomorfo, *Magnaporthe oryzae*, y un nombre en estado anamorfo correspondiente, *Pyricularia oryzae*, que se usan dependiendo de la situación. El hongo del añublo en la presente invención incluye todos estos hongos del añublo, independientemente de sus nombres.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “susceptibilidad al añublo” significa la propiedad de una planta de infectarse con añublo (lo que significa en ocasiones que los síntomas son significativos). El término “resistencia de campo al añublo” significa la diferencia en los síntomas o la propiedad de suprimir el número o el tamaño de las manchas, que se reconocen como la diferencia en el número o el tamaño de manchas entre variedades o líneas (dentro de la misma especie vegetal) cuando se infectan plantas con el hongo del añublo. El término “resistencia verdadera” significa la propiedad de una planta de producir la muerte celular mediante una reacción de hipersensibilidad en células invadidas por el hongo del añublo para prevenir la infección.

20 La presente descripción proporciona el gen Pi21 de susceptibilidad al añublo, implicado en el añublo de plantas, y pi21, un gen que confiere resistencia de campo al añublo.

Más específicamente, el gen Pi21 comprende lo siguiente:

- (a) un ADN que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ó 22;
- (b) un ADN que comprende la región codificante de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 20 ó 21;
- 35 (c) un ADN que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ó 22, y que tiene una función equivalente a la de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ó 22; y
- 40 (d) un ADN que se hibrida con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 20 ó 21 en condiciones rigurosas, y que codifica una proteína que tiene la función equivalente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ó 22.

Además, el gen pi21 comprende específicamente lo siguiente:

- (a) un ADN que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
- (b) un ADN que comprende la región codificante de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 ó 5;
- 45 (c) un ADN que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y que tiene la función equivalente a la de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y
- 50 (d) un ADN que hibrida con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 ó 5 en condiciones rigurosas, y que codifica una proteína que tiene la función equivalente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Usando el gen Pi21 o el gen pi21, se vuelve posible, por ejemplo, preparar proteínas recombinantes o generar plantas transformadas con resistencia de campo al añublo modificada.

Las plantas de las que se derivan los genes descritos incluyen, pero no se limitan particularmente a, por ejemplo, monocotiledóneas tales como arroz, maíz, trigo, cebada, avena, lágrimas de Job, ballico italiano, ballico perenne, fleo, festuca de los prados, mijo, panizo, caña de azúcar, y mijo perla; y dicotiledóneas tales como colza, soja, algodón, tomate y patata. También incluyen plantas con floración tales como crisantemo, rosa, clavel y ciclamen, pero no se limitan particularmente a las mismas.

No hay ninguna restricción particular en las formas del "gen Pi21" y el "gen pi21", siempre que puedan codificar para la "proteína Pi21" y "proteína pi21", respectivamente; y el "gen Pi21" y el "gen pi21" comprenden cada uno un ADN genómico, ADN sintetizado químicamente, etcétera, así como un ADNc. Además, el gen Pi21 y el gen pi21 comprenden un ADN con cualquier secuencia de nucleótidos basada en la degeneración del código genético, siempre que codifiquen para la proteína Pi21 y la proteína pi21, respectivamente.

Un experto en la técnica puede preparar ADNc y ADN genómicos usando medios convencionales. Los ADN genómicos pueden prepararse, por ejemplo, extrayendo los ADN genómicos de una planta; construyendo una biblioteca genómica (puede usarse un plásmido, fago, cósmido, BAC, PAC o similares como vector); desarrollándolo; y realizando hibridación en colonias o hibridación en placas de lisis usando una sonda preparada basándose en el gen Pi21 o el gen pi21 (por ejemplo, el ADN de uno cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 20 ó 21). Alternativamente, los ADN genómicos pueden prepararse mediante la preparación de cebadores específicos para el gen Pi21 o el gen pi21 y realizando PCR usando estos cebadores. Los ADNc pueden prepararse, por ejemplo, sintetizando los ADNc basándose en ARNm extraídos de una planta; insertándolos en vectores tales como λ ZAP para crear una biblioteca de ADNc; desarrollándola; y realizando hibridación en colonias o hibridación en placas de lisis tal como se describió anteriormente. También pueden prepararse realizando PCR.

Además, puesto que se considera que el gen Pi21 o el gen pi21 están ampliamente presentes en el reino vegetal, el gen Pi21 o el gen pi21 también incluyen no sólo genes en arroz sino también genes homólogos presentes en diversas plantas. En el presente documento, la expresión "gen homólogo" se refiere a un gen en diversas plantas que codifica una proteína que tiene una función fisiológica (por ejemplo, susceptibilidad al añublo o resistencia de campo al añublo) similar a la del producto del gen Pi21 o el producto del gen pi21 en arroz.

Los métodos para aislar genes homólogos bien conocidos para un experto en la técnica incluyen la técnica de hibridación (Southern E.M., *Journal of Molecular Biology*, Vol. 98, 503, 1975) y técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki, R.K., *et al. Science*, vol. 230, 1350-1354, 1985; Saiki, R.K. *et al. Science*, vol. 239, 487-491, 1988). Específicamente, un experto en la técnica puede aislar habitualmente genes homólogos del gen Pi21 o el gen pi21 de diversas plantas, usando como sonda las secuencias de nucleótidos (por ejemplo, la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 20 ó 21) del gen Pi21 o gen pi21 del arroz, o una parte del mismo, o usando como cebadores oligonucleótidos que se hibridan específicamente con el gen Pi21 o el gen pi21.

Para aislar ADN que codifican para tales genes homólogos, la reacción de hibridación se realiza habitualmente en condiciones rigurosas. Los ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas incluyen las condiciones de urea 6 M, SDS al 0,4% y 0,5x SSC, o condiciones de hibridación de rigurosidad equivalente. Puede esperarse el aislamiento de ADN con mayor homología usando condiciones con mayor rigurosidad, por ejemplo, urea 6 M, SDS al 0,4% y 0,1x SSC. Las secuencias de los ADN aislados pueden determinarse mediante un método conocido. La homología de los ADN aislados indica una identidad de secuencia de al menos el 50% o más, más preferiblemente el 70% o más, todavía más preferiblemente el 90% o más (por ejemplo, el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) con respecto a toda la secuencia de aminoácidos. Puede determinarse la homología de secuencia usando los programas de BLASTN (nivel de ácido nucleico) o BLASTX (nivel de aminoácidos) (Altschul *et al. J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990). Los programas se basan en el algoritmo BLAST de Karlin y Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2264-2268, 1990; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877, 1993). Cuando se analiza una secuencia de nucleótidos mediante BLASTN, se fijan los parámetros en, por ejemplo, puntuación = 100 y longitud de palabra = 12. Cuando se analiza una secuencia de aminoácidos mediante BLASTX, los parámetros se fijan, por ejemplo, en puntuación = 50 y longitud de palabra = 3. Alternativamente, una secuencia de aminoácidos puede analizarse usando el programa Gapped BLAST según indican Altschul *et al. (Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997). Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros por defecto de cada programa. Se conocen los procedimientos específicos de estos métodos de análisis.

La presente descripción también proporciona los siguientes ADN que se usan para suprimir la expresión endógena del gen Pi21 de la planta:

(a) un ADN que codifica un ARN complementario a un producto de transcripción del gen Pi21,

(b) un ADN que codifica un ARN que tiene la actividad ribozima para escindir específicamente un producto de transcripción del gen Pi21,

(c) un ADN que codifica un ARN que inhibe la expresión del gen Pi21 mediante un efecto de cosupresión, y

(d) un ADN que codifica un ARN que tiene la actividad iARN para cortar específicamente un producto de transcripción del gen Pi21.

Estos ADN pueden suprimir la progresión de manchas por el añublo en plantas.

Las plantas en las que se suprime la expresión del gen Pi21 no están limitadas particularmente, y puede usarse cualquier planta a la que se desee conferir resistencia de campo al añublo; sin embargo, los cultivos agrícolas y las plantas ornamentales son adecuados desde un punto de vista industrial. Los cultivos agrícolas útiles incluyen, pero no se limitan particularmente a, monocotiledóneas tales como arroz, maíz, trigo, cebada, avenas, lágrimas de Job, ballico italiano, ballico perenne, fleo, festuca de los prados, mijo, panizo, caña de azúcar, y mijo perla; y dicotiledóneas tales como colza, soja, algodón, tomate y patata. Las plantas ornamentales incluyen plantas con floración tales como crisantemo, rosa, clavel y ciclamen, pero no se limitan a las mismas. Las plantas susceptibles al hongo del añublo del arroz incluyen hierbas de pasto tales como cebada, ballico italiano y festuca de los prados; y maíz. Además, se ha notificado que muchas plantas pueden parasitarse por el hongo del añublo separado del arroz, incluyendo la tribu *Oryzeae* tal como *Leersia oryzoides* y arroz silvestre; tribu *Poeae*; tribu *Triticeae*; tribu *Aveneae* tal como avena; tribu *Chloridineae* tal como *Eragrostis curvula*; y tribu *Panicaceae* tal como panizo y digitaria. Estas plantas también están incluidas en las plantas a las que puede conferirse resistencia de campo al añublo.

Tal como se usa en el presente documento, "supresión de la expresión del gen Pi21" incluye la supresión de la transcripción génica y la supresión de la traducción para dar una proteína. Además, incluye no sólo la detención completa de la expresión de ADN, sino también la reducción de la expresión.

Una realización de "un ADN usado para suprimir la expresión del gen Pi21" es un ADN que codifica un ARN antisentido complementario al gen Pi21. Usando el método de expresión génica temporal, se demostró el efecto antisentido en una célula vegetal por primera vez mediante el hecho de que un ARN antisentido introducido mediante electroporación presentaba un efecto antisentido en una planta (Ecker y Davis, Proc. Natl. Acad. USA, 83: 5372, 1986). Posteriormente, también se ha notificado que la expresión de ARN antisentido en tabaco y petunia reduce la expresión génica diana (Krol *et. al.*, Nature 333: 866, 1988). En la actualidad, se establece como medio para suprimir la expresión génica en plantas.

Existen varios factores implicados en la acción de ácidos nucleicos antisentido en la supresión de la expresión génica diana, según se indica tal como sigue: inhibir la iniciación de la transcripción formando cadenas triples; suprimir la transcripción mediante la hibridación con un sitio en el que la ARN polimerasa ha formado una estructura de bucle abierto local; inhibir la transcripción mediante la hibridación con el ARN que está sintetizándose; suprimir el corte y empalme mediante la hibridación con una unión intrón-exón; suprimir el corte y empalme mediante la hibridación con el sitio de formación del espliceosoma; suprimir la transferencia desde el núcleo al citoplasma mediante la hibridación con un ARNm; suprimir el corte y empalme mediante la hibridación con un sitio de adición de poli(A) o sitio de adición de caperuza; suprimir la iniciación de la traducción mediante la hibridación con un sitio de unión de factor de iniciación de la traducción; suprimir la traducción mediante la hibridación con un sitio de unión al ribosoma próximo al codón de iniciación; impedir la elongación de la cadena peptídica mediante la hibridación con una región de traducción de ARNm o sitio de unión al polisoma; y suprimir la expresión génica mediante la hibridación con un sitio de interacción de ácido nucleico-proteína. Los ácidos nucleicos antisentido suprimen la expresión génica diana inhibiendo el proceso de transcripción, corte y empalme o traducción (Hirashima e Inoue, 1993, "Shin Seikagaku Jikken Kouza (Conferencias de Nueva Experimentación en Bioquímica) 2, Kakusan (Ácidos Nucleicos) IV, Idenshi No Fukusei To Hatsugen (Replicación y Expresión de Genes)", The Japanese Biochemical Society Ed., Tokyo Kagaku Dojin, págs. 319-347).

Las secuencias antisentido descritas en el presente documento pueden suprimir la expresión de un gen diana mediante cualquiera de las acciones anteriores. Como una realización, una secuencia antisentido diseñada para ser complementaria a una región no traducida próxima al extremo 5' del ARNm de un gen será eficaz en la inhibición de la traducción de ese gen. Sin embargo, también puede usarse una secuencia complementaria a una región codificante, o a una región no traducida del extremo 3'. De esta manera, los ADN que comprenden secuencias antisentido de las regiones traducidas de un gen así como regiones no traducidas están incluidas en los ADN antisentido. Un ADN antisentido que va a usarse en el presente documento se liga en el sentido de 3' de un promotor apropiado, y una secuencia que comprende una señal de terminación de la transcripción se liga preferiblemente al lado 3' del ADN.

Los ADN antisentido pueden prepararse, por ejemplo, basándose en la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 1, 2, 20 ó 21 usando el método del fosforotioato (Stein, Nucleic Acids Res., 16: 3209-3221, 1988) y otros. Los ADN así preparados pueden transformarse en una planta deseada usando métodos conocidos. Las secuencias de ADN antisentido son preferiblemente secuencias complementarias a un producto de transcripción de un gen endógeno de la planta que va a transformarse, pero no es necesario que sean perfectamente complementarias siempre que puedan inhibir eficazmente la expresión génica. Los ARN transcritos son preferiblemente complementarios en el 90% o más (por ejemplo, el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) a los productos de transcripción de los genes diana. Para inhibir eficazmente la expresión génica diana usando una secuencia antisentido, un ADN antisentido debe comprender al menos 15 nucleótidos o más, preferiblemente 100 nucleótidos o más, e incluso más preferiblemente 500 nucleótidos o más. Los ADN antisentido que van a usarse tienen generalmente menos de 5 kb, y preferiblemente menos de 2,5 kb de longitud.

- 5 La supresión de la expresión endógena del gen Pi21 también puede llevarse a cabo usando ADN que codifican para ribozimas. El término “ribozima” se refiere a una molécula de ARN que tiene actividad catalítica. Algunas ribozimas tienen muchas actividades diferentes. Entre ellas, la investigación sobre ribozimas como enzimas de escisión de ARN ha permitido diseñar ribozimas para escindir ARN en sitios específicos. Las ribozimas incluyen las de 400 nucleótidos o más, tales como M1RNA en ARNasaP, o las ribozimas de tipo intrón de grupo 1. En cambio, existen también ribozimas de tipo cabeza de martillo o de tipo horquilla que comprenden un dominio activo de aproximadamente 40 nucleótidos (Koizumi, M. y Ohtsuka, E., 1990, *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, 35: 2191-2200).
- 10 Por ejemplo, el dominio de autoescisión de una ribozima de tipo cabeza de martillo escinde en el lado 3' de C15 en G13U14C15. El apareamiento de bases entre U14 y A9 es importante para la actividad ribozima. Se ha mostrado que la escisión puede producirse si está A o U en lugar de C en la 15ª posición (Koizumi, M. *et al.*, 1988, *FEBS Lett.* 228: 228-230). Si el sitio de unión al sustrato de la ribozima está diseñado para ser complementario a las secuencias de ARN adyacentes al sitio diana, puede crearse una ribozima de escisión de ARN similar a una enzima de restricción que reconoce la secuencia UC, UU o UA dentro del ARN diana (Koizumi *et al.*, 1988, *FEBS Lett.* 239: 285; Koizumi, M. y Ohtsuka, E., 1990, *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, 35: 2191; Koizumi *et al.*, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 7059).
- 15 Las ribozimas de tipo horquilla también son útiles para los objetivos de la presente invención. Una ribozima de tipo horquilla puede encontrarse, por ejemplo, en la cadena negativa del ARN satélite del virus de la mancha anillada del tabaco (Buzayan, *Nature* 323: 349, 1986). También se ha demostrado que esta ribozima puede diseñarse para escindir de manera específica para la diana un ARN (Kikuchi y Sasaki, *Nucleic Acids Res.* 19: 6751, 1992; Kikuchi, H., *Kagaku to Seibutsu (Química y Biología)* 30: 112, 1992).
- 20 Para transcribirse en células vegetales, se liga una ribozima diseñada para escindir una diana a una secuencia de terminación de la transcripción o un promotor tal como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Sin embargo, si se añaden secuencias adicionales al extremo 5' o 3' del ARN transcrito, puede perderse la actividad ribozima. En este caso, puede situarse otra ribozima de corte que actúa en cis, en el lado 5' o 3' de la parte de ribozima para cortar con precisión sólo la parte de ribozima del ARN transcrito que comprende la ribozima (Taira *et al.*, *Protein Eng.* 3: 733, 1990; Dzianott y Bujarski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4823, 1989; Grosshans y Cech, *Nucleic Acids Res.* 19: 3875, 1991; Taira *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19: 5125, 1991).
- 25 Además, estas unidades estructurales puede disponerse en tándem para escindir múltiples sitios dentro de un gen diana, logrando así mayores efectos (Yuyama *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 1271, 1992). Usando estas clases de ribozimas, los productos de transcripción de los genes diana de la presente descripción pueden escindirse específicamente, y puede suprimirse la expresión génica.
- 30 La supresión de la expresión génica endógena también puede lograrse mediante la “cosupresión” que resulta de la transformación con un ADN que comprende una secuencia idéntica o similar a una secuencia de gen diana. El término “cosupresión” se refiere al fenómeno en el que, cuando un gen que comprende una secuencia idéntica o similar a la del gen endógeno diana se introduce en plantas mediante transformación, se suprime la expresión tanto del gen exógeno introducido como del gen endógeno diana. Se desconoce el mecanismo detallado de la cosupresión, pero se observa frecuentemente en plantas (Curr. Biol., 7: R793, 1997; Curr. Biol. 6: 810, 1996).
- 35 Por ejemplo, para obtener una planta en la que el gen Pi21 se cosuprime, se transforman plantas de interés con un ADN vector construido para expresar el gen Pi21 o un ADN que comprende una secuencia similar, y se seleccionan plantas con una característica de un Pi21 mutante, es decir, plantas con resistencia de campo al añublo, de las plantas así obtenidas. Los genes que van a usarse para la cosupresión no tienen que ser completamente idénticos al gen diana; sin embargo, tienen una identidad de secuencia de al menos el 70% o más, preferiblemente el 80% o más, y más preferiblemente el 90% o más (por ejemplo, el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más).
- 40 Además, la supresión de la expresión génica endógena también puede lograrse transformando una planta con un gen que comprende una característica que es dominante negativa para el gen diana. Un “gen que comprende una característica dominante negativa” se refiere a un gen que, cuando se expresa, tiene la función de eliminar o reducir la actividad de un gen de tipo natural endógeno original de la planta.
- 45 Otra realización de “un ADN usado para suprimir la expresión del gen Pi21” es un ADN que codifica un ARN bicatenario (ARNbc) complementario a un producto de transcripción de un gen endógeno Pi21. Introduciendo un ARNbc que comprende una secuencia idéntica o similar a una secuencia de gen diana en una célula, puede provocarse un fenómeno denominado iARN (interferencia de ARN), en la que se suprimen la expresión tanto del gen foráneo introducido como del gen endógeno diana. Cuando se introduce en una célula un ARNbc de aproximadamente 40 a varios cientos de pares de bases, una nucleasa similar a ARNasa III que comprende un dominio helicasa, denominado Dicer, elimina por corte partes de aproximadamente 21 a 23 pares de bases del extremo terminal 3' del ARNbc en presencia de ATP, produciendo de ese modo un ARNic (ARN de interferencia corto). Este ARNic se une a una proteína específica para formar un complejo de nucleasa (RISC: complejo de silenciamiento inducido por ARN). Este complejo reconoce y se une a una secuencia idéntica al ARNic, y corta el producto de transcripción (ARNm) del gen diana en la parte central del ARNic con la actividad enzimática similar a
- 50
- 55

ARNasa III. Aparte de esta ruta, una cadena antisentido de ARNic se une a un ARNm para actuar como cebador de una ARN polimerasa dependiente de ARN (APdA), sintetizando de este modo un ARNbc. También se considera otra ruta en la que este ARNbc sirve de nuevo como sustrato de Dicer, produce un nuevo ARNic, y amplifica su efecto.

5 La iARN se descubrió en primer lugar en nematodos (Fire, A. *et al.*, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391, 806-811, 1998). En la actualidad, se observa no sólo en nematodos, sino también en diversos organismos tales como plantas, nematelmintos, *Drosophila* y protozoos (Fire, A. RNA-triggered gene silencing. Trends Genet. 15, 358-363 (1999); Sharp, P. A. RNA interference 2001. Genes Dev. 15, 485-490 (2001); Hammond, S. M., Caudy, A. A. & Hannon, G. J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. Nature Rev. Genet. 2, 110-119 (2001); Zamore, P. D. RNA interference: listening to the sound of silence. Nat Struct Biol. 8, 746-750 (2001)). En estos organismos, se confirmó que la expresión génica diana se suprimía realmente mediante la introducción externamente de un ARNbc. Además, iARN está usándose ahora como método para crear organismos deficientes.

10 Cuando se halló inicialmente el iARN, se creía que sólo era eficaz un ARNbc de una determinada longitud (40 bases) o más. Sin embargo, Tuschl *et al.* de la Universidad de Rockefeller, Estados Unidos, notificaron que introduciendo un ARNbc corto (ARNic) de aproximadamente 21 pares de bases en una célula, se obtenía un efecto de iARN en una célula de mamífero sin provocar una reacción antiviral mediante PKR (Tuschl, Nature, 411, 494-498 (2001)). Por tanto, la iARN ha atraído repentinamente la atención como técnica aplicable a células de mamífero diferenciadas tales como células humanas.

15 Los ADN descritos en el presente documento comprenden un ADN de código antisentido que codifica un ARN antisentido correspondiente a cualquier región de un producto de transcripción (ARNm) de un gen diana, y un ADN de código homosen­tido que codifica un ARN homosen­tido correspondiente a cualquier región del ARNm. Los ARN antisentido y ARN homosen­tido mencionados anteriormente pueden expresarse a partir de los ADN de código antisentido y ADN de código homosen­tido mencionados anteriormente. También puede producirse un ARNbc a partir de estos ARN antisentido y ARN homosen­tido. Una secuencia diana no está limitada particularmente, siempre que la expresión del gen Pi21 se suprima introduciendo en una célula un ARNbc que comprende una secuencia idéntica o similar a la secuencia diana. Un ejemplo de la secuencia diana incluye una secuencia de región no traducida en 3' del gen Pi21. Una secuencia de región no traducida en 3' del gen Pi21 se muestra en las SEQ ID NO: 11 y 24.

20 Un sistema de expresión de ARNbc se mantiene tal como sigue en un vector o similar: un ARN antisentido y un ARN homosen­tido se expresan desde el mismo vector; o un ARN antisentido y un ARN homosen­tido se expresan desde diferentes vectores, respectivamente. Por ejemplo, cuando se expresa un ARN antisentido y un ARN homosen­tido desde el mismo vector, se construyen en cada caso un casete de expresión de ARN antisentido y un casete de expresión de ARN homosen­tido, en los que un promotor como el sistema de pol III que puede expresar un ARN corto se conecta en el sentido de 5' del ADN de código antisentido y ADN de código homosen­tido, respectivamente, y estos casetes se insertan entonces en un vector en el mismo sentido o en el sentido contrario.

25 También puede construirse un sistema de expresión en el que un ADN de código antisentido y un ADN de código homosen­tido se disponen en sentidos contrarios en cadenas diferentes de modo que están enfrentados entre sí. Esta construcción puede portar un ADN bicatenario (ADN de código de ARNic) en el que una cadena codificante de ARN antisentido y una cadena codificante de ARN homosen­tido se aparean, y promotores que están orientados de manera opuesta en ambos lados de modo que pueden expresarse el ARN antisentido y el ARN homosen­tido de cada cadena. En este caso, para impedir la adición de una secuencia excedente en el sentido de 3' del ARN homosen­tido y el ARN antisentido, está situado preferiblemente un terminador en el extremo terminal 3' de cada cadena (la cadena codificante de ARN antisentido y la cadena codificante de ARN homosen­tido). Puede usarse una secuencia de cuatro o más bases A (adenina) consecutivas para este terminador. Además, en este sistema de expresión de tipo palíndromo, las clases de los dos promotores son preferiblemente diferentes entre sí.

30 Cuando se expresa un ARN antisentido y ARN homosen­tido desde diferentes vectores, por ejemplo, se realizan los siguientes procedimientos: se construyen un casete de expresión de ARN antisentido y un casete de expresión de ARN homosen­tido, en cada uno de los cuales un promotor tal como el sistema de pol III que puede expresar un ARN corto, se conecta en el sentido de 5' del ADN de código antisentido o el ADN de código homosen­tido; y luego se mantienen estos casetes en diferentes vectores.

35 Como para la iARN, puede usarse un ARNic como ARNbc. El término "ARNic" significa un ARN bicatenario que incluye cadenas cortas que no presentan toxicidad dentro de una célula, y no se limita a la longitud completa de 21 a 23 pares de bases notificada por Tuschl *et al.* (*ibid.*); y no está limitada particularmente, siempre que la longitud esté en un intervalo tal que no presente toxicidad. Por ejemplo, un ARNic puede ser de 15 a 49 pares de bases, preferiblemente de 15 a 35 pares de bases, y todavía más preferiblemente de 21 a 30 pares de bases de longitud. Alternativamente, la longitud de la parte de ARN bicatenario final que resulta de la transcripción de un ARNic que va a expresarse, puede ser de 15 a 49 pares de bases, preferiblemente de 15 a 35 pares de bases, y más preferiblemente de 21 a 30 pares de bases, por ejemplo.

Como ADN, también puede usarse una construcción de este tipo que se produce insertando una secuencia

adecuada (una secuencia de intrón es preferible) entre las repeticiones invertidas de una secuencia diana (Smith, N.A., *et al.* Nature, 407: 319, 2000; Wesley, S.V. *et al.* Plant J. 27: 581, 2001; Piccin, A. *et al.* Nucleic Acids Res. 29: E55, 2001) y produce un ARN bicatenario que tiene una estructura en horquilla (ARN en "horquilla" autocomplementario (ARNh)).

- 5 Aunque no se requiere que un ADN usado para iARN sea completamente igual a un gen diana, tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% o más, preferiblemente el 80% o más, todavía más preferiblemente el 90% o más (por ejemplo, el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más). La identidad de secuencia puede determinarse usando los procedimientos mencionados anteriormente.

- 10 Las partes de ARN bicatenario en ARNbc, en los que los ARN están apareados, no están necesariamente apareados por completo, sino que pueden comprender partes no apareadas debido a un apareamiento erróneo (las bases correspondientes no son complementarias), un bulto (no existe una base correspondiente en una cadena) o similares. Pueden estar incluidos tanto bultos como apareamientos erróneos en las regiones de ARN bicatenario en las que los ARN están apareados entre sí en ARNbc.

- 15 También se proporcionan vectores y células transformadas que comprenden uno cualquiera del gen Pi21, el gen pi21 y los ADN que suprimen la expresión del gen Pi21.

- 20 Con respecto a los vectores anteriores, por ejemplo, cuando el huésped es *E. coli*, siempre que el vector tenga un "ori" para la amplificación en *E. coli*, de manera que se amplifican los vectores y se preparan en grandes cantidades en *E. coli* (por ejemplo, JM109, DH5 α , HB101 y XL1Blue) u otros, y además tenga un gen de selección para *E. coli* transformado (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos que permite la discriminación usando un determinado fármaco (ampicilina, tetraciclina, kanamicina o cloranfenicol)), los vectores no están limitados particularmente. Los vectores incluyen, por ejemplo, vectores M13, vectores pUC, pBR322, pBluescript y pCR-Script. Además de los vectores anteriores también pueden usarse, por ejemplo, pGEM-T, pDIRECT y pT7 para la subclonación y escisión de los ADNc. Cuando se usan vectores para producir el gen Pi21, el gen pi21 y los ADN que suprimen la expresión del gen Pi21, los vectores de expresión son particularmente útiles. Cuando se expresa un vector de expresión en *E. coli*, por ejemplo, debe tener las características anteriores para amplificarse en *E. coli*. Adicionalmente, cuando *E. coli* tal como JM109, DH5 α , HB101 o XL1-Blue se usan como el huésped, el vector debe tener un promotor que permite la expresión eficaz en *E. coli*, por ejemplo, un promotor lacZ (Ward *et al.* Nature 341:544-546, 1989; FASEB J. 6: 2422-2427, 1992, promotor araB (Better *et al.* Science 240:1041-1043, 1988) o promotor T7. Otros ejemplos de los vectores incluyen pGEX-5X-1 (Pharmacia), "sistema QIAexpress" (QIAGEN), pEGFP y pET.

- 30 Además, el vector puede comprender una secuencia señal para la secreción de polipéptidos. Cuando se producen polipéptidos en el periplasma de *E. coli*, puede usarse la secuencia señal pelB (Lei, S. P. *et al.* J. Bacteriol. 169:4379 (1987)) como secuencia señal para la secreción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden usarse métodos con cloruro de calcio o métodos de electroporación para introducir el vector en una célula huésped.

- 35 Además de *E. coli*, también pueden usarse vectores de expresión derivados de mamíferos (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (Nucleic Acids Res. 18(17): 5322 (1990)), pEF y pCDM8), células de insecto (por ejemplo, "sistema de expresión en baculovirus Bac-to-BAC" (GIBCO-BRL) y pBacPAK8), plantas (por ejemplo, pMH1 y pMH2), virus de animales (por ejemplo, pHSV, pMV y pAdexLcw), retrovirus (por ejemplo, pZIPneo), levaduras (por ejemplo, "kit de expresión en Pichia" (Invitrogen), pNV11 y SP-Q01), y *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pPL608 y pKTH50) como vectores para producir el gen Pi21, el gen pi21 y los ADN que suprimen la expresión del gen Pi21.

- 40 Para la expresión en células animales tales como células CHO, COS y NIH3T3, el vector debe tener un promotor necesario para la expresión en tales células, por ejemplo, un promotor de SV40 (Mulligan *et al.* Nature 277: 108 (1979)), promotor de MMLV-LTR, promotor EF1 α (Mizushima *et al.* Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990)) o promotor de CMV. Es incluso más preferible que el vector comprenda un gen para seleccionar transformantes (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos que permite la discriminación mediante un fármaco (tal como neomicina y G418)). Los ejemplos de vectores con tales características incluyen pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

La introducción de un ADN tal como el descrito en el presente documento en una célula puede llevarse a cabo mediante un método conocido para un experto en la técnica, por ejemplo, mediante un método de electroporación.

- 50 Además, la descripción proporciona células vegetales transformadas en las que se ha introducido el ADN que codifica la proteína Pi21 o un ADN que suprime la expresión del gen Pi21; plantas transformadas derivadas de las células; plantas transformadas que son progenies o clones de las plantas transformadas; y materiales de propagación de las plantas transformadas. También se proporcionan métodos para producir los transformantes y materiales de propagación mencionados anteriormente.

El ADN que codifica la proteína Pi21 o los ADN que suprimen la expresión del gen Pi21 pueden introducirse en células vegetales mediante los métodos anteriores.

- 55 Además, también es posible la regeneración de plantas usando métodos conocidos para los expertos en la técnica, según el tipo de célula vegetal (Toki *et al.*, Plant Physiol., 100: 1503-1507, 1995). En el arroz, por ejemplo, ya están

- establecidas varias técnicas para producir plantas transformadas, y se usan ampliamente en el campo técnico de la presente invención. Estos métodos incluyen el método para introducir genes en protoplastos usando polietilenglicol y luego regenerando plantas (adecuado para variedades de arroz indias) (Datta *et al.*, en Gene Transfer To Plants. Potrykus, I. y Spangenberg, G. Eds., págs. 66-74, 1995), el método para introducir genes en protoplastos un impulso eléctrico y luego regenerando plantas (adecuado para variedades japonesas de arroz) (Toki *et al.*, Plant Physiol. 100: 1503-1507, 1992), el método para introducir directamente genes en células, usando el método de la pistola genética y luego regenerando plantas (Christou *et al.*, Bio/technology, 9: 957-962, 1991), y el método para introducir genes mediante un *Agrobacterium*, y luego regenerando plantas (Hiei *et al.*, Plant J., 6: 271-282, 1994). Estos métodos pueden usarse apropiadamente en la presente invención.
- 5 Cuando se usa el método de *Agrobacterium* anterior, se usa el método de Nagel *et al.* (Microbiol. Lett. 67: 325, 1990), por ejemplo. En este método, se transforma un vector recombinante en un *Agrobacterium*, y posteriormente el *Agrobacterium* transformado se introduce en una célula mediante un método conocido tal como el método de los discos foliares. El vector mencionado anteriormente comprende un promotor de la expresión de modo que, por ejemplo, el ADN que codifica la proteína Pi21 de la presente invención o un ADN que suprime la expresión del gen Pi21 se expresa en una planta tras la introducción en la planta. Generalmente, un ADN que codifica la proteína Pi21 de la presente invención o un ADN que suprime la expresión del gen Pi21 está ubicado en el sentido de 3' del promotor, y un terminador está ubicado más alejado en el sentido de 3' de un ADN de este tipo. El vector recombinante usado para este fin se selecciona de manera adecuada por un experto en la técnica, dependiendo del tipo de planta o método de introducción. Los promotores mencionados anteriormente incluyen, por ejemplo, el promotor derivado del virus del mosaico de la coliflor CaMV35S y el promotor de ubiquitina del maíz (documento JP-A H2-79983).
- 10 Ejemplos del terminador mencionado anteriormente pueden ser un terminador derivado del virus del mosaico de la coliflor y el terminador del gen de la nopalina sintasa; sin embargo, el promotor y el terminador no se limitan a los mismos, siempre que funcionen en una planta.
- 15 Las plantas en las que se introduce el ADN que codifica la proteína Pi21 o un ADN que suprime la expresión del gen Pi21, pueden ser explantes, o el ADN puede introducirse en las células cultivadas preparadas a partir de estas plantas. "Células vegetales" incluyen, por ejemplo, células vegetales de una hoja, raíz, tallo, flor y escutelo en una semilla; callos; y células cultivadas en suspensión.
- 20 Para seleccionar eficazmente las células transformadas introduciendo el ADN que codifica la proteína Pi21 o un ADN que suprime la expresión del gen Pi21, el vector recombinante mencionado anteriormente se introduce en las células vegetales, preferiblemente junto con un gen marcador de selección adecuado o un vector plasmídico que comprende un gen marcador de selección. Los genes marcadores de selección usados para este fin incluyen, por ejemplo, el gen de la higromicina fosfotransferasa resistente al antibiótico higromicina, el de neomicina fosfotransferasa resistente a kanamicina o gentamicina, y el gen de la acetiltransferasa resistente al herbicida fosfotricina.
- 25 Las células en las que se ha introducido el vector recombinante se colocan en un medio de selección conocido que contiene un agente de selección adecuado dependiendo del tipo de gen marcador de selección introducido, y luego se cultivan. De esta manera, pueden obtenerse las células cultivadas de plantas transformadas.
- 30 A continuación, se cultivan cuerpos vegetales reproducidos a partir de las células transformadas en un medio de aclimatación. Entonces se hacen crecer los cuerpos vegetales regenerados, aclimatados en condiciones de cultivo habituales para obtener cuerpos vegetales que tienen resistencia de campo al añublo, a partir de los cuales pueden obtenerse semillas una vez que maduran y dan frutos.
- 35 Puede confirmarse la presencia de los ADN foráneos introducidos en las plantas transformadas que se regeneran y se hacen crecer de esta manera mediante el método de PCR o el método de hibridación de tipo Southern conocidos, o analizando las secuencias de nucleótidos de los ADN en los cuerpos vegetales.
- 40 En este caso, la extracción de los ADN de las plantas transformadas puede llevarse a cabo según el método conocido de J. Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
- 45 Cuando se analizan los genes foráneos que están presentes en los cuerpos vegetales regenerados e incluyen los ADN de la presente invención, usando el método de PCR, se lleva a cabo una reacción de amplificación usando como molde los ADN extraídos de los cuerpos vegetales regenerados tal como se mencionó anteriormente. También puede realizarse una reacción de amplificación en una mezcla de reacción que contiene como cebadores oligonucleótidos sintetizados que comprenden las secuencias de nucleótidos seleccionadas de manera adecuada según las secuencias de nucleótidos de los ADN descritos en el presente documento o los ADN modificados descritos en el presente documento. En la reacción de amplificación, pueden repetirse reacciones de desnaturalización, hibridación y extensión de los ADN decenas de veces para obtener fragmentos de los productos de ADN amplificados que comprenden las secuencias de ADN de la presente invención. Sometiendo la mezcla de reacción que comprende los productos amplificados, por ejemplo, a electroforesis en agarosa, se fraccionan las diversas clases de fragmentos de ADN amplificados, permitiendo de ese modo la confirmación de si un determinado
- 50
- 55

fragmento de ADN corresponde a un ADN tal como se describe en el presente documento.

Tras obtener una planta transformada en la que se ha introducido en el cromosoma un ADN que codifica la proteína Pi21 de la presente invención o un ADN que suprime la expresión del gen Pi21, pueden obtenerse progenies mediante reproducción sexual o asexual de la planta. Además, también pueden obtenerse materiales de propagación (por ejemplo, semillas, frutos, panículas, tubérculos, raíces tuberosas, portainjertos, callos y protoplastos) a partir de la planta o sus progenies o clones, y estos materiales pueden usarse para producir en masa las plantas. Se dan a conocer células vegetales en las que se ha introducido el ADN que codifica la proteína Pi21 o un ADN que suprime la expresión del gen Pi21; plantas que comprenden las células; progenies y clones de las plantas; y materiales de propagación de las plantas y sus progenies y clones. Tales células vegetales, plantas que comprenden las células, progenies y clones de las plantas, y materiales de propagación de las plantas y sus progenies y clones, pueden usarse en métodos para conferir a plantas resistencia de campo al añublo.

La presente invención proporciona además métodos para conferir a plantas resistencia de campo al añublo, que comprenden la etapa de expresar un ADN que suprime la expresión del gen Pi21 en células de cuerpos vegetales. Puede conferirse a plantas resistencia de campo al añublo introduciendo en células vegetales vectores que comprenden, en un estado expresable, un ADN que suprime la expresión del gen Pi21, usando los métodos mencionados anteriormente, y mediante regeneración de las plantas usando estas células.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “conferir” resistencia de campo al añublo” significa no sólo proporcionar una capacidad de resistencia de campo al añublo a plantas que no tienen capacidad de resistencia de campo al añublo, sino también adicionalmente aumentar la capacidad de resistencia de campo al añublo de plantas que ya la tienen.

En la presente invención, las plantas en las que se suprime la expresión del gen Pi21 y a las que se les confiere resistencia de campo al añublo, no están limitadas particularmente; y tales plantas incluyen, por ejemplo, las plantas mencionadas anteriormente.

También se proporcionan en el presente documento proteínas codificadas por el gen Pi21, métodos para producir las proteínas, y anticuerpos que se unen a las proteínas.

Las proteínas recombinantes se preparan normalmente insertando ADN que codifican las proteínas descritas en el presente documento en vectores de expresión apropiados, introduciendo los vectores en células apropiadas, cultivando las células transformadas, y purificando las proteínas expresadas. Las proteínas recombinantes puede expresarse como proteínas de fusión con otras proteínas para facilitar la purificación, por ejemplo, como proteínas de fusión con proteínas de unión a maltosa usando *Escherichia coli* como huésped (New England Biolabs, EE.UU., serie de vectores pMAL), como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST) (Amersham Pharmacia Biotech, serie de vectores pGEX), o marcados con histidina (Novagen, serie pET). Las células huésped no están limitadas particularmente, siempre que la célula sea adecuada para expresar las proteínas recombinantes. Es posible usar, por ejemplo, células de levadura, de diversas plantas o animales, células de insecto u otras además del *E. coli* descrito anteriormente. Pueden introducirse vectores en células huésped mediante una variedad de métodos conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse métodos de introducción que usan iones calcio para la introducción en *E. coli* (Mandel, M. & Higa, A. Journal of Molecular Biology, Vol. 53, 158-162 (1970); Hanahan, D. Journal of Molecular Biology, Vol. 166, 557-580 (1983)). Pueden purificarse las proteínas recombinantes expresadas en las células huésped y recuperarse de las células huésped o el sobrenadante de cultivo de las mismas mediante métodos conocidos en la técnica. Cuando se expresan proteínas recombinantes como proteínas de fusión con las proteínas de unión a maltosa u otras mencionadas anteriormente, puede llevarse a cabo fácilmente purificación por afinidad.

Las proteínas recombinantes obtenidas pueden usarse para preparar anticuerpos que se unen a las proteínas. Pueden obtenerse anticuerpos policlonales tal como sigue, por ejemplo: se inmunizan animales pequeños tales como conejos con la proteína Pi21, una proteína recombinante expresada como una proteína de fusión con GST en microorganismos tales como *E. coli*, o su péptido parcial para obtener sueros. Los anticuerpos se preparan mediante purificación de los sueros usando, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, una columna con proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico de DEAE, o una columna de afinidad acoplada con la proteína Pi21 o un péptido sintético. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales tal como sigue: se inmunizan animales pequeños tales como ratones con la proteína Pi21 o su péptido parcial; se extrae el bazo de los ratones y se tritura para separar las células; se fusionan las células y células de mieloma de ratón usando un reactivo tal como polietilenglicol; y de las células fusionadas (hibridomas) así obtenidas, se seleccionan los clones que producen anticuerpos que se unen a la proteína Pi21. Posteriormente, se trasplantan los hibridomas obtenidos en la cavidad abdominal de los ratones, se recoge la ascitis de los ratones para preparar anticuerpos monoclonales, por ejemplo, mediante purificación usando precipitación con sulfato de amonio, una columna con proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico de DEAE, una columna de afinidad acoplada con la proteína Pi21 o un péptido sintético. Los anticuerpos así obtenidos pueden usarse para purificación, detección y similares de las proteínas descritas en el presente documento.

La presente invención proporciona oligonucleótidos que comprenden al menos 15 nucleótidos que son

complementarios al gen pi21, un ADN que comprende el gen Pi21, o la cadena complementaria de los mismos.

Una "cadena complementaria" en el presente documento se refiere a una cadena con respecto a la otra cadena en un ácido nucleico bicatenario que comprende pares de bases de A:T (U para ARN) y G:C. El término "complementario" significa no sólo que una secuencia es completamente complementaria en una región de al menos 15 nucleótidos consecutivos, sino también que una secuencia tiene una homología de al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente el 90%, todavía más preferiblemente el 95% o más en la secuencia de nucleótidos. Puede usarse cualquier algoritmo conocido para un experto en la técnica para determinar la homología.

Los oligonucleótidos descritos pueden usarse como sondas o cebadores para la detección y la amplificación de ADN que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 20 ó 21. Además, los oligonucleótidos descritos pueden usarse en forma de un sustrato de matriz de ADN.

Cuando se usa un oligonucleótido de este tipo como cebador, la longitud es habitualmente de 15 pb a 100 pb, y preferiblemente de 17 pb a 30 pb. El cebador no está limitado particularmente, siempre que puede amplificar al menos una parte de un ADN descrito o su cadena complementaria. Cuando se usa como cebador, su región del lado 3' se hace que sea complementaria, y puede añadirse una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción, una etiqueta o similares en su lado 5'.

Cuando el oligonucleótido mencionado anteriormente se usa como sonda, puede usarse cualquier oligonucleótido sin ninguna limitación particular, siempre que pueda hibridarse específicamente con al menos una parte de un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 20 ó 21 o su cadena complementaria. La sonda puede ser un oligonucleótido sintético, y habitualmente tiene una longitud de al menos 15 pb o más.

Cuando se usa un oligonucleótido como el descrito en el presente documento como sonda, se marca preferiblemente según sea apropiado. Los métodos de marcado incluyen lo siguiente, por ejemplo: un método en el que se fosforila el extremo 5' de un oligonucleótido mediante ³²P usando polinucleótido cinasa de T4; y un método (el método de cebado aleatorio o similares) en el que se incorporan bases del sustrato marcadas con un isótopo tal como ³²P, un colorante fluorescente o biotina, en un oligonucleótido, usando una ADN polimerasa tal como la enzima de Klenow y usando oligonucleótidos de hexámeros aleatorios y similares como cebador.

Los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden producirse, por ejemplo, con un sintetizador de oligonucleótidos disponible comercialmente. Las sondas también pueden producirse como fragmentos de ADN bicatenario obtenidos mediante tratamiento con enzimas de restricción o similares.

Además, la presente descripción proporciona usos de los ADN que suprimen la expresión del gen Pi21 y vectores que comprenden los ADN. Es decir, la presente descripción se refiere a agentes para aumentar la resistencia de campo al añublo en plantas, que comprenden uno cualquiera de un ADN que suprime la expresión del gen Pi21 y un vector que comprende el ADN como componente activo. Además, la presente descripción se refiere a usos de los ADN que suprimen la expresión del gen Pi21 y vectores que comprenden los ADN, para preparar agentes para aumentar la resistencia de campo al añublo en plantas.

Los agentes para aumentar la resistencia de campo al añublo en plantas pueden incluir, por ejemplo, agua esterilizada, solución salina fisiológica, aceite vegetal, tensioactivos, lípidos, agentes de solubilización, tampones y conservantes, si es necesario, además de los componentes activos, es decir, los oligonucleótidos.

La presente descripción también proporciona marcadores moleculares ligados al gen de susceptibilidad Pi21 o al gen de resistencia pi21.

La expresión "marcador molecular" significa una región de ADN que se liga genéticamente al gen Pi21 o al gen pi21 y que puede distinguirse de las demás regiones de ADN.

En general, cuando la distancia en el mapa entre un gen y un marcador molecular expresada con unidades cM es menor, el marcador molecular está ubicado más próximo al gen. Un marcador molecular de este tipo es muy útil porque se heredará junto con el gen. Se demostró que pi21 estaba ubicado entre el marcador "Pa102484" y el marcador "P702D3_#12" (figura 2c). Por consiguiente, en los métodos descritos en el presente documento, entre los marcadores moleculares descritos en la figura 2c, los dos marcadores anteriores y los marcadores ubicados entre los dos marcadores ("P702D03_#38", "P702D03_#79", "P702D03_#80") son preferibles. Entre ellos, "P702D03_#79" es un marcador especialmente preferible y puede ponerse como ejemplo como el ADN de SEQ ID NO: 7 ó 23 (ligado al gen de susceptibilidad Pi21), o SEQ ID NO: 10 (ligado al gen de resistencia pi21).

Los marcadores moleculares descritos en el presente documento incluyen marcadores de sitio de secuencia etiquetada (STS). La expresión "marcador de STS" se refiere a una región de ADN que puede usarse para evaluar la presencia o ausencia de polimorfismo de un sitio de secuencia etiquetada (STS) en un ADN, y el término "STS" se refiere a un sitio de secuencia específica en una posición particular de un ADN. El polimorfismo de STS puede detectarse como la presencia o ausencia de bandas o la diferencia en la posición de bandas, amplificando una

región de ADN que comprende un sitio de secuencia específica con un método de amplificación de ácido nucleico tal como el método de PCR, y luego sometiendo los productos de amplificación a electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa.

5 Cuando se usa un marcador de STS como marcador molecular, los métodos de identificación pueden llevarse a cabo tal como sigue, por ejemplo. En primer lugar, se preparan muestras de ADN mediante un método bien conocido a partir de una planta de arroz de prueba y a partir de una planta de arroz que tiene resistencia de campo al añublo. A continuación, se lleva a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, el método de PCR) usando los ADN preparados como molde y usando los ADN cebadores. Se comparan los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados entre la planta de arroz de prueba y un marcador ligado al gen para la resistencia de campo al añublo (por ejemplo, el marcador de SEQ ID NO: 10) mediante electroforesis o similares, y cuando muestran el mismo genotipo, se evalúa que la planta de prueba tiene resistencia de campo al añublo.

15 Un experto en la técnica puede diseñar de manera apropiada los ADN cebadores óptimos usados para los métodos de identificación descritos en el presente documento, considerando la información de secuencia sobre diversos marcadores moleculares. Habitualmente, los cebadores mencionados anteriormente son un conjunto de cebadores que consisten en un par de cebadores que están diseñados para intercalar una secuencia de nucleótidos que existe específicamente en el arroz y se liga al gen Pi21 o el gen pi21, para amplificar la secuencia de nucleótidos.

Específicamente, los conjuntos de cebadores para marcadores de STS pueden incluir los siguientes, por ejemplo:

- (a) un conjunto de cebadores que consiste en los cebadores 5'-AGA AGG TGG AGT ACG ACG TGA AGA-3' (SEQ ID NO: 8) y 5'-AGT TTA GTG AGC CTC TCC ACG ATT A-3' (SEQ ID NO: 9),
- 20 (b) un conjunto de cebadores que consiste en los cebadores 5'-GTA CGA CGT GAA GAA CAA CAG G-3' (SEQ ID NO: 16) y 5'-GCT TGG GCT TGC AGT CC-3' (SEQ ID NO: 17), y
- (c) un conjunto de cebadores que consiste en los cebadores 5'-GAT CCT CAT CGT CGA CGT CTG GC-3' (SEQ ID NO: 26) y 5'-AGG GTA CGG CAC CAG CTT G-3' (SEQ ID NO: 27).

25 Puede evaluarse la presencia de resistencia de campo al añublo en la planta de arroz de prueba comparando la información caracterizada mediante las secuencias de ADN amplificadas usando estos conjuntos de cebadores con los marcadores moleculares descritos en el presente documento.

Además de los cebadores mencionados anteriormente, un experto en la técnica puede producir conjuntos de cebadores que tienen una función similar utilizando la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 4 ó 20. Los cebadores descritos en el presente documento también comprenden tales cebadores.

30 Un experto en la técnica puede producir cebadores de PCR de la presente invención usando, por ejemplo, un sintetizador de oligonucleótidos automático. Un experto en la técnica también puede realizar los métodos descritos en el presente documento usando un método de detección de polimorfismos conocido tal como el método de PCR-SSCP mencionado anteriormente usando los cebadores de PCR anteriores, o similares.

35 Cuando los marcadores moleculares de la presente invención están ubicados en exones de un ADN genómico, también es posible utilizar RT-PCR usando ARNm como molde. Usando el sistema Taqman (una detección por PCR cuantitativa) (Roche), puede detectarse la presencia o ausencia de productos de amplificación mediante fluorescencia. Puesto que este sistema no necesita electroforesis, permite que se lleven a cabo los métodos de identificación en un tiempo corto.

40 Se proporcionan además métodos para evaluar si las plantas de prueba tienen resistencia de campo al añublo cuando el peso molecular o la secuencia de nucleótidos concuerda con el/la del gen pi21, comprendiendo los métodos las siguientes etapas (a) a (c):

- (a) preparar muestras de ADN a partir de plantas de prueba;
- (b) amplificar la región del gen Pi21 o el gen pi21 a partir de las muestras de ADN; y
- 45 (c) comparar el peso molecular o la secuencia de nucleótidos de los fragmentos de ADN amplificados con el/la del gen pi21.

Un experto en la técnica puede preparar (extraer) las muestras de ADN mencionadas anteriormente mediante métodos conocidos. Los métodos de preparación preferibles incluyen, por ejemplo, un método para extraer los ADN usando el método de CTAB.

50 Las muestras de ADN usadas en los métodos de identificación como los descritos en el presente documento no están limitadas particularmente; sin embargo, habitualmente se usan los ADN genómicos extraídos a partir de una planta de prueba, arroz. La fuente para la extracción de ADN genómico no está limitada particularmente, y los ADN pueden extraerse de cualquier tejido de arroz. Pueden extraerse, por ejemplo, de una panícula, hoja, raíz, tallo,

semilla, parte del endospermo, salvado o embrión.

5 En los métodos descritos para identificar la resistencia de campo al añublo en plantas, posteriormente se lleva a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, el método de PCR) usando los ADN preparados como molde y usando los ADN cebadores. Los fragmentos de ADN amplificados se escinden mediante enzimas de restricción, y se comparan los tamaños de los fragmentos de ADN escindidos entre las plantas de prueba y las plantas que tienen resistencia de campo al añublo, mediante electroforesis o similares. Cuando el peso molecular o la secuencia de nucleótidos concuerda con el/la de las plantas comparadas, se evalúa si las plantas de prueba tienen resistencia de campo al añublo. Las "plantas que tienen resistencia de campo al añublo" incluyen la *Owarihatamochi* descrita en los ejemplos, pero no se limitan a la misma.

10 En los métodos descritos para evaluar si las plantas de prueba tienen resistencia de campo al añublo, la expresión "concuerda con" significa que el peso molecular o la secuencia de nucleótidos de ambos genes de un alelo concuerda con el/la de una planta que tiene resistencia de campo al añublo, o que la secuencia de aminoácidos deducida de tales genes concuerda con la de la planta.

15 Por consiguiente, cuando el peso molecular, la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos deducida de un gen de un alelo difiere del/de la de una planta que tiene resistencia de campo al añublo, pero el/la del otro gen del alelo es igual que el/la de la planta, tal caso no está incluido en la expresión "concuerda con".

El análisis mediante electroforesis mencionado anteriormente puede llevarse a cabo según un método convencional. Por ejemplo, se lleva a cabo la electroforesis aplicando voltaje en un gel de agarosa o poliacrilamida, y se analiza el patrón de ADN separado.

20 La presente descripción también proporciona métodos para evaluar si las plantas de prueba tienen resistencia de campo al añublo cuando la movilidad en el gel concuerda con la del gen pi21, comprendiendo los métodos las siguientes etapas (a) a (d):

(a) preparar muestras de ADN a partir de plantas de prueba;

(b) amplificar la región del gen Pi21 o el gen pi21 a partir de las muestras de ADN;

25 (c) separar los ADN bicatenarios amplificados en un gel no desnaturizante; y

(d) comparar la movilidad de los ADN bicatenarios separados en el gel con la del gen pi21.

La presente descripción proporciona además métodos para evaluar si las plantas de prueba tienen resistencia de campo al añublo cuando la movilidad en el gel concuerda con la del gen pi21, comprendiendo los métodos las siguientes etapas (a) a (e):

30 (a) preparar muestras de ADN a partir de plantas de prueba;

(b) amplificar la región del gen Pi21 o el gen pi21 a partir de las muestras de ADN;

(c) disociar los ADN amplificados en ADN monocatenarios;

(d) separar los ADN monocatenarios disociados en un gel no desnaturizante; y

(e) comparar la movilidad de los ADN monocatenarios separados en el gel con la del gen pi21.

35 Los métodos anteriores incluyen el método PCR-SSCP (polimorfismo de conformación monocatenaria) ("Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11". Genomics, 1 de enero de 1992, 12(1): 139-146; "Detection of p53 gen mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products". Oncogene, 1 de agosto de 1991; 6(8): 1313-1318; "Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling". PCR Methods Appl. 1 de abril de 1995; 4(5): 275-282). Este método es particularmente preferible para el examen de muchas muestras de ADN, puesto que tiene ventajas tales como una simplicidad comparativa de operación y una pequeña cantidad de muestra de prueba requerida. El principio del método es tal como sigue. Un ADN monocatenario disociado de un fragmento de ADN bicatenario forma una conformación superior única, dependiendo de la secuencia de nucleótidos respectiva. Tras electroforesis sobre un gel de poliacrilamida sin desnaturizante, ADN monocatenarios complementarios que tienen la misma longitud de cadena se desplazan a diferentes posiciones según la diferencia de las conformaciones superiores respectivas. La conformación de un ADN monocatenario cambia incluso mediante una sustitución de una base, cambio que da como resultado una movilidad diferente en electroforesis en gel de poliacrilamida. Por consiguiente, puede detectarse la presencia de una mutación en un fragmento de ADN debida a una mutación puntual, delección, inserción y otros detectando los cambios en la

40

45

50

movilidad.

Más específicamente, en primer lugar se amplifica una región que comprende un sitio diana del gen Pi21 o el gen

5 pi21 mediante el método de PCR o similares. Preferiblemente, una región que va a amplificarse es de aproximadamente 100 pb a 600 pb de longitud. Al amplificar fragmentos génicos mediante PCR, pueden marcarse los fragmentos de ADN que van a sintetizarse usando cebadores marcados con un isótopo tal como ³²P, un colorante fluorescente, biotina, etcétera, o añadiendo nucleótidos sustrato marcados con un isótopo tal como ³²P, un colorante fluorescente, biotina, etcétera, a la disolución de reacción de PCR. Alternativamente, pueden marcarse los fragmentos de ADN sintetizados tras la reacción de PCR añadiendo nucleótidos sustrato marcados con un isótopo tal como ³²P, un colorante fluorescente, biotina, etcétera usando la enzima de Klenow y otros. Los fragmentos de ADN así obtenidos se someten a electroforesis en forma de una cadena doble en un gel de poliacrilamida sin un desnaturizante tal como urea. Alternativamente, tales fragmentos de ADN pueden desnaturizarse mediante calentamiento y similares, y luego someterse a electroforesis en un gel de poliacrilamida sin un desnaturizante tal como urea. Las condiciones para separar fragmentos de ADN pueden mejorarse añadiendo cantidades apropiadas (aproximadamente del 5% al 10%) de glicerol al gel de poliacrilamida. Además, aunque varíen las condiciones de electroforesis dependiendo de las propiedades de los fragmentos de ADN respectivos, habitualmente se lleva a cabo a temperatura ambiente (de 20°C a 25°C). Cuando no puede lograrse una separación preferible, se selecciona una temperatura para lograr la movilidad óptima de temperaturas entre 4°C y 30°C. Tras la electroforesis, se detecta la movilidad de los fragmentos de ADN mediante autorradiografía usando películas de rayos X, un escáner para detectar fluorescencia y similares, para analizar el resultado. Cuando se detectan bandas con diferente movilidad, puede confirmarse la presencia de una mutación escindiendo directamente las bandas del gel, amplificándolas de nuevo mediante PCR, y secuenciando directamente los fragmentos amplificados. Incluso cuando no se usan ADN marcados, también pueden detectarse las bandas mediante tinción del gel tras la electroforesis con bromuro de etidio, plata y otros.

La presente descripción proporciona además métodos para evaluar si las plantas de prueba tienen resistencia de campo al añublo cuando los tamaños de los fragmentos de ADN detectados concuerdan con los del gen pi21, comprendiendo los métodos las siguientes etapas (a) a (e):

- 25 (a) preparar muestras de ADN a partir de plantas de prueba;
- (b) amplificar la región del gen Pi21 o el gen pi21 a partir de las muestras de ADN;
- (c) escindir las muestras de ADN preparadas con enzimas de restricción;
- (d) separar los fragmentos de ADN según sus tamaños; y
- (e) comparar los tamaños de los fragmentos de ADN detectados con los del gen pi21.

30 Los métodos anteriores incluyen el método de RFLP que usa polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y el método PCR-RFLP. Generalmente se usan enzimas de restricción como enzimas para escindir los ADN. Específicamente, cuando existe una adición o delección de nucleótidos en el sitio de reconocimiento de una enzima de restricción, o cuando existe una inserción o delección de nucleótidos en un fragmento de ADN generado mediante un tratamiento con enzimas de restricción, los tamaños de los fragmentos generados tras el tratamiento con enzimas de restricción difieren entre plantas susceptibles al añublo y plantas que tienen resistencia de campo al añublo. Se amplifica la parte que comprende un sitio de mutación de este tipo mediante el método de PCR, y luego se trata con cada enzima de restricción para detectar el sitio polimórfico como una diferencia en la movilidad de bandas mediante electroforesis. Alternativamente, puede detectarse un sitio polimórfico tratando ADN cromosómicos con una enzima de restricción de este tipo, sometiendo los fragmentos a electroforesis, y luego llevando a cabo transferencia de tipo Southern con un ADN sonda. Las enzimas de restricción que van a usarse pueden seleccionarse apropiadamente según los sitios de mutación respectivos. En este método, puede realizarse la transferencia de tipo Southern no sólo en ADN genómicos sino también en ADNc que se sintetizan por una transcriptasa inversa a partir de ARN preparados a partir de sujetos y luego escindidos directamente con enzimas de restricción. Alternativamente, puede amplificarse una parte o la totalidad del gen Pi21 o el gen pi21 mediante PCR usando tales ADNc como molde, y escindirse con enzimas de restricción, y luego puede examinarse la diferencia en movilidad.

Se proporcionan además métodos para evaluar si las plantas de prueba tienen resistencia de campo al añublo cuando la movilidad en el gel concuerda con la del gen pi21, comprendiendo los métodos las siguientes etapas (a) a (d):

- 50 (a) preparar muestras de ADN a partir de plantas de prueba;
- (b) amplificar la región del gen Pi21 o el gen pi21 a partir de las muestras de ADN;
- (c) separar los ADN amplificados en un gel con una concentración creciente gradualmente de un ADN desnaturizante; y
- (d) comparar la movilidad de los ADN separados en el gel con la del gen pi21.

55 El método de electroforesis en gel con gradiente de desnaturizante (método DGGE) puede ponerse como ejemplo de uno de tales métodos. Se amplifica una región que comprende un sitio diana del gen Pi21 o el gen pi21 mediante

el método de PCR y similares usando un cebador descrito en el presente documento y otros; se someten a electroforesis los productos resultantes en un gel de poliacrilamida con una concentración creciente gradualmente de un desnaturizante tal como urea; y se compara el resultado con el de un sujeto sano. Puede identificarse un polimorfismo detectando la diferencia en movilidad de los fragmentos de ADN, puesto que la tasa de movilidad de los fragmentos con mutaciones disminuye drásticamente a medida que los fragmentos de ADN se convierten en ADN monocatenarios en puntos de menor concentración de desnaturizante.

Además de los métodos mencionados anteriormente, puede usarse el método de hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO). Se prepara un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos en la que se predice que existe un polimorfismo, y se somete a hibridación con una muestra de ADN. Cuando existe un nucleótido polimórfico diferente del oligonucleótido en el ADN muestra usado para hibridación, se reduce la eficacia de hibridación. Puede detectarse la reducción de la eficacia de hibridación mediante el método de transferencia de tipo Southern; métodos que utilizan reactivos fluorescentes específicos que tienen una característica que se extingue mediante intercalación en un hueco de un híbrido; y similares.

Además, puede llevarse a cabo la detección mediante el método de truncamiento por apareamiento erróneo de ribonucleasa A. Específicamente, se amplifica una región que comprende un sitio diana del gen Pi21 o el gen pi21 mediante el método de PCR y similares, y los productos amplificados se hibridan con ARN marcados que se preparan a partir de ADN de tipo sano y otros incorporados en un vector de plásmido y similares. Puesto que el híbrido forma una conformación monocatenaria en una parte que comprende un nucleótido diferente del tipo sano, puede detectarse un polimorfismo escindiendo esta parte con ribonucleasa A y luego realizando autorradiografía y similares.

La expresión "planta de prueba" no está limitada particularmente, sino que incluye todas las plantas que pueden infectarse con el hongo del añublo. Un ejemplo preferible es el arroz. Puede usarse cualquier variedad de arroz sin ninguna restricción particular, tal como las variedades de arroz indica o japónica, y las variedades/líneas híbridas indica-japónicas, arroz silvestre, o variedades híbridas o cruzadas de arroz de cultivar silvestre.

La presente descripción también proporciona métodos para evaluar la resistencia de campo al añublo en arroz usando como indicador un marcador molecular que se liga al gen pi21 y comprende al menos el ADN de SEQ ID NO: 7, 10 ó 23. Los marcadores moleculares preferibles de la presente invención incluyen "P702D03_#38", "P702D03_#79" y "P702D03_#80", tal como se mencionó anteriormente. Entre ellos, "P702D03_#79" es un marcador especialmente preferible, y puede ser el ADN de SEQ ID NO: 7 ó 23 (ligado al gen de susceptibilidad Pi21) o SEQ ID NO: 10 ligado al gen de resistencia pi21), por ejemplo. Los métodos de identificación de la presente descripción usan como indicador al menos "P702D03_#79" entre estos marcadores moleculares. Por tanto, en los métodos de identificación de la presente descripción, "P702D03_#79" puede usarse solo o en combinación con otros marcadores. Las combinaciones de "P702D03_#79" con otros marcadores incluyen la combinación con "P702D03_#38", la combinación con "P702D03_#80", y combinaciones con otros marcadores cualesquiera.

En los métodos de identificación de la presente descripción, puede evaluarse la resistencia de campo al añublo en plantas de arroz de prueba específica y eficazmente examinando si comprenden un marcador molecular ligado al gen pi21. En los métodos de evaluación de la presente descripción, cuando una planta de arroz deseada que va a evaluarse por si tiene o no resistencia de campo al añublo comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10, se evalúa que la planta de arroz de prueba tiene resistencia de campo al añublo. Cuando la planta de arroz de prueba no comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 (cuando comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7 ó 23), se evalúa que es susceptible al añublo.

Pueden compararse marcadores moleculares en plantas de arroz de prueba con los de la presente descripción no sólo para las secuencias de ADN de marcadores moleculares; sino también para la información caracterizada por las secuencias de ADN. La información caracterizada por las secuencias de ADN de marcadores moleculares incluye información sobre el peso molecular de los marcadores moleculares y sobre la presencia o ausencia de un sitio de mutación y un sitio polimórfico comprendidos en los marcadores moleculares. Un experto en la técnica puede identificar sitios polimórficos (sitios de delección y sitios de sustitución de una sola base) comparando la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 con la de SEQ ID NO: 7 ó 23 usando métodos conocidos. Los métodos de evaluación descritos también pueden realizarse detectando tal información sobre la presencia o ausencia de un sitio de mutación o sitio polimórfico comprendido en marcadores moleculares.

La información anterior sobre la presencia o ausencia de un sitio de mutación o sitio polimórfico puede detectarse usando cebadores que pueden amplificar una región que comprende un sitio de mutación o sitio polimórfico, o usando una sonda (por ejemplo, el ADN que comprende la totalidad o una parte de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 18, 19 ó 25) que puede hibridarse con un sitio de mutación o sitio polimórfico, así como determinando directamente las secuencias.

Usando los métodos de evaluación descritos, se vuelve posible seleccionar en una fase temprana plantas (por ejemplo, arroz) que van a identificarse como que tienen resistencia de campo al añublo. Específicamente, la presente descripción proporciona métodos para seleccionar plantas que tienen resistencia de campo al añublo, que comprenden las siguientes etapas (a) y (b):

(a) producir variedades en las que plantas (por ejemplo, arroz) que tienen resistencia de campo al añublo se han cruzado con plantas (por ejemplo, arroz) que tienen funciones arbitrarias;

(b) evaluar si las plantas obtenidas en la etapa (a) tienen resistencia de campo al añublo mediante los métodos descritos en el presente documento para evaluar si plantas de prueba tienen resistencia de campo al añublo.

5 El término “planta” no está limitado particularmente en la presente descripción, pero preferiblemente se refiere a arroz. Ejemplos específicos de arroz son tal como se mencionaron anteriormente.

10 Usando los métodos de selección de la presente descripción, se vuelve posible seleccionar en una fase temprana plantas (por ejemplo, arroz) que van a identificarse como que tienen resistencia de campo al añublo. La presente invención también proporciona métodos de este tipo para seleccionar en una fase temprana plantas que van a identificarse como que tienen resistencia de campo al añublo. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “fase temprana” se refiere a, por ejemplo, el estado antes del espigazón del arroz, y preferiblemente el estado inmediatamente después de la germinación. Usando los métodos de selección descritos, se vuelve posible cultivar variedades que tienen resistencia de campo al añublo en un periodo más corto que anteriormente.

15 La presente descripción se refiere a métodos de examen para determinar agentes para prevenir o mejorar el añublo en plantas. La primera realización de los métodos de examen descritos incluye métodos de examen para determinar agentes para prevenir o mejorar el añublo en plantas, que comprenden las siguientes etapas (a) a (c):

(a) poner en contacto compuestos de prueba con un producto de transcripción del gen Pi21;

(b) detectar la unión de los compuestos de prueba al producto de transcripción del gen Pi21; y

(c) seleccionar compuestos de prueba que se unen al producto de transcripción del gen Pi21.

20 En la primera realización, en primer lugar se ponen compuestos de prueba en contacto con el producto de transcripción del gen Pi21. “Producto de transcripción del gen Pi21” en los métodos de examen descritos incluye no sólo el producto de transcripción del gen Pi21, sino también el producto de traducción traducido a partir del producto de transcripción.

25 Los “compuestos de prueba” en los métodos descritos no están limitados particularmente, e incluyen, por ejemplo, compuestos individuales tales como compuestos naturales, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, proteínas y péptidos; así como bibliotecas de compuestos, productos de expresión de genotecas, extractos celulares, sobrenadantes de cultivos celulares, productos de fermentación, microorganismos, extractos de organismos marinos, extractos vegetales, extractos de células procariotas, extractos de eucariotas unicelulares y extractos de células animales. Si fuese necesario, pueden marcarse apropiadamente los compuestos de prueba anteriores antes de su uso. Los marcadores incluyen, por ejemplo, radiomarcadores y marcadores fluorescentes.

30 En la presente descripción, “poner en contacto” se lleva a cabo tal como sigue. Por ejemplo, si el producto de transcripción del gen Pi21 está en un estado purificado, puede llevarse a cabo el contacto añadiendo compuestos de prueba a la preparación purificada. Si el producto de transcripción está en el estado expresado en células, o en el estado expresado en extractos celulares, puede llevarse a cabo el contacto añadiendo compuestos de prueba a los cultivos celulares o a los extractos celulares, respectivamente. Las células descritas no están limitadas particularmente, pero son preferibles células derivadas de plantas incluyendo arroz. Cuando los compuestos de prueba son proteínas, también puede llevarse a cabo el contacto, por ejemplo, introduciendo vectores que comprenden los ADN que codifican para las proteínas en células que expresan el gen Pi21, o añadiendo los vectores a extractos celulares en los que se expresa el gen Pi21. Además, por ejemplo, pueden utilizarse dos métodos híbridos que usan células de levadura o animales.

35 La unión entre el producto de transcripción del gen Pi21 mencionado anteriormente y los compuestos de prueba se detecta posteriormente. La detección o la medición de la unión entre proteínas pueden llevarse a cabo usando, por ejemplo, marcadores unidos a las proteínas. Los tipos de marcadores incluyen, marcadores fluorescentes y radiomarcadores, por ejemplo. La unión también puede medirse mediante métodos conocidos tales como el método de dos híbridos en levadura y el método que usa BIACORE. En los presentes métodos, se seleccionan entonces los compuestos de prueba unidos a la enzima de biosíntesis mencionada anteriormente. Entre los compuestos de prueba seleccionados, están incluidos agentes para prevenir o mejorar el añublo en plantas. Pueden usarse los compuestos de prueba seleccionados como compuestos de prueba en los exámenes siguientes.

40 Además, los métodos de examen descritos proporcionan métodos de examen para determinar agentes para prevenir o mejorar el añublo en plantas, que comprenden las siguientes etapas (a) a (c):

(a) poner en contacto compuestos de prueba con células recogidas de plantas;

(b) medir el nivel de expresión del producto de transcripción del gen Pi21; y

(c) seleccionar los compuestos de prueba que disminuyen el nivel de expresión del producto de transcripción en

comparación con cuando no se ponen en contacto los compuestos de prueba con las células.

En primer lugar se ponen los compuestos de prueba en contacto con células recogidas de plantas. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “células recogidas de una planta” puede ser una planta arbitraria que tiene claramente un gen de susceptibilidad al añublo. Las expresiones “compuesto de prueba” y “poner en contacto” se refieren a lo mismo que se mencionó anteriormente.

Posteriormente se mide el nivel de expresión de la “proteína Pi21. El nivel de expresión de la proteína Pi21 puede medirse mediante métodos conocidos para un experto en la técnica. Por ejemplo, se extrae ARNm que codifica la proteína Pi21 según un método convencional, y puede medirse el nivel de transcripción del gen Pi21 realizando el método de hibridación de tipo Northern o el método de RT-PCR usando este ARNm como molde. Además, el nivel de expresión de la proteína Pi21 puede medirse usando técnicas de matriz de ADN.

También puede medirse el nivel de traducción del gen recogiendo fracciones que comprenden la proteína Pi21 según un método habitual, y detectando la expresión de la proteína Pi21 mediante electroforesis tales como SDS-PAGE. También puede medirse el nivel de traducción del gen realizando el método de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo contra la proteína Pi21 para detectar la expresión de la proteína Pi21.

Los anticuerpos usados para la detección de la proteína Pi21 no están limitados particularmente, siempre que puedan detectar la proteína Pi21. Pueden usarse tanto anticuerpos monoclonales como anticuerpos policlonales, por ejemplo. Los anticuerpos pueden prepararse tal como se mencionó anteriormente, mediante métodos conocidos para un experto en la técnica.

En la segunda realización, a continuación, cuando el nivel de expresión de la proteína Pi21 disminuye en comparación con cuando no se pone en contacto con los compuestos de prueba, los compuestos de prueba se seleccionan como agentes para prevenir o mejorar el añublo en plantas.

Los métodos de examen de la presente descripción proporcionan métodos de identificación de agentes para prevenir o mejorar el añublo en plantas, que comprenden las siguientes etapas (a) a (d):

(a) proporcionar células o extractos celulares que comprenden ADN en los que un gen indicador está unido operativamente en el sentido de 3' de la región promotora del gen Pi21;

(b) poner en contacto compuestos de prueba con las células o los extractos celulares;

(c) medir el nivel de expresión del gen indicador en las células o los extractos celulares; y

(d) seleccionar compuestos de prueba que disminuyen el nivel de expresión del gen indicador en comparación a cuando no se pone en contacto con los compuestos de prueba.

En primer lugar, se proporcionan las células o los extractos celulares que comprenden ADN en los que un gen indicador está unido operativamente en el sentido de 3' de la región promotora del gen Pi21.

La expresión “unido operativamente” significa que la región promotora del gen Pi21 y un gen indicador se conectan entre sí de modo que puede inducirse la expresión del gen indicador mediante la unión de un factor de transcripción a la región promotora del gen Pi21. Por tanto, la expresión “unido operativamente” también incluye los casos en los que un gen indicador se conecta a otro gen y produce una proteína fusionada con otro producto génico, siempre que se induzca la expresión de la proteína fusionada mediante la unión de un factor de transcripción a la región promotora del gen Pi21.

El gen indicador no está limitado particularmente, siempre que pueda detectarse su expresión. Por ejemplo, los genes indicadores usados generalmente por los expertos en la técnica incluyen el gen CAT, gen lacZ, gen de la luciferasa, gen de la β -glucuronidasa (GUS) y gen GFP.

Las células o extractos celulares mencionados anteriormente se ponen en contacto posteriormente con los compuestos de prueba. Luego, se mide el nivel de expresión del gen indicador en las células o los extractos celulares. Las expresiones “compuesto de prueba” y “poner en contacto” se refieren a lo mismo que se mencionó anteriormente.

El nivel de expresión del gen indicador puede determinarse usando métodos conocidos para los expertos en la técnica, según el tipo de gen indicador. Por ejemplo, cuando se usa el gen CAT como el gen indicador, puede determinarse el nivel de expresión del gen CAT midiendo la acetilación del cloranfenicol, provocada por el producto del gen CAT. Cuando se usa el gen lacZ como el gen indicador, puede determinarse su nivel de expresión analizando la coloración de un compuesto colorante debida a la acción catalítica del producto de expresión del gen.

Puede determinarse el nivel de expresión del gen de la luciferasa como indicador midiendo la fluorescencia de un compuesto fluorescente, provocada por la acción catalítica del producto de expresión del gen de la luciferasa. Puede determinarse el nivel de expresión del gen de la β -glucuronidasa (GUS) analizando la coloración de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucuronido (X-Gluc) o la luminiscencia de Glucuron (ICN), provocadas por la acción catalítica del

producto de expresión del gen GUS. Puede determinarse el nivel de expresión del gen GFP midiendo la fluorescencia debida a la proteína GFP.

5 El nivel de expresión de los genes mencionados anteriormente disminuye en comparación con cuando no se ponen en contacto con los compuestos de prueba, los compuestos de prueba se seleccionan como agentes para prevenir o mejorar el añublo en plantas.

Los métodos de identificación descritos en el presente documento proporcionan métodos de identificación de agentes para prevenir o mejorar el añublo en plantas, que comprenden las siguientes etapas (a) a (c):

(a) regenerar plantas transformadas a partir de células vegetales transformadas en las que se ha introducido el gen Pi21;

10 (b) poner en contacto el hongo del añublo y compuestos de prueba con las plantas transformadas; y

(c) seleccionar compuestos de prueba que suprimen el añublo en las plantas transformadas en comparación con cuando no se ponen en contacto con los compuestos de prueba.

15 En primer lugar, las plantas transformadas se regeneran a partir de células vegetales transformadas que comprenden el gen Pi21. Las plantas transformadas pueden regenerarse tal como se mencionó anteriormente, mediante un método conocido para un experto en la técnica.

20 El hongo del añublo y los compuestos de prueba se ponen en contacto con las plantas transformadas regeneradas en la etapa (a). Las expresiones "hongo del añublo" y "compuesto de prueba" son iguales a como se mencionaron anteriormente. Un ejemplo de "poner en contacto" es un método para pulverizar directamente un compuesto de prueba sobre una planta usando un pulverizador. Sin embargo, "poner en contacto" en la cuarta realización no se limita a ello, sino que incluye cualquier método, siempre que puedan ponerse en contacto físicamente las plantas y los compuestos de prueba. El contacto puede realizarse poniendo en contacto los compuestos de prueba con plantas transformadas infectadas con el hongo del añublo, o mediante la infección con el hongo del añublo de plantas transformadas que se han puesto en contacto con compuestos de prueba.

25 Se seleccionan los compuestos de prueba que suprimen el añublo en plantas transformadas en comparación con cuando no se ponen en contacto con compuestos de prueba. Puede determinarse si se suprime o no el añublo usando como indicador un fenotipo de las plantas transformadas. Los fenotipos de las plantas transformadas no están limitados particularmente, sino que incluyen la alteración del color y la necrotización de una parte completa de una planta, o una parte de la misma. Además, la supresión del añublo en las plantas transformadas incluye no sólo la supresión completa sino también la supresión parcial.

30 La presente descripción también se refiere a kits para su uso en los métodos de examen descritos anteriormente. Tales kits pueden comprender materiales usados en la etapa de detección y/o la etapa de medición en los métodos de examen descritos anteriormente. Por ejemplo, tales materiales pueden incluir sondas, cebadores, anticuerpos y disoluciones de tinción, que son necesarios para medir el nivel de expresión del gen Pi21. Además, los kits pueden comprender agua destilada, sales, disoluciones tampón, estabilizadores de proteínas, conservantes y similares.

35 Ejemplos

[Ejemplo 1] Mapeo genético

40 Se realizó un análisis de ligamiento detallado de la región de pi21 usando una población de segregación a gran escala indispensable para clonación basada en mapa. Como la población para los análisis de ligamiento, se usaron 72 muestras de la población BC1F2. Esta población BC1F2 se obtuvo realizando retrocruzamiento de manera continua de la variedad de arroz con cáscara *Nipponbare* o *Aichi Asahi* (figura 1) que comprende el alelo de susceptibilidad Pi21 que no suprime la progresión de manchas con la variedad de arroz de secano japonesa *Owarihatamochi* que comprende el alelo de resistencia pi21 que suprime la progresión de manchas. Como resultado del análisis de ligamiento con marcadores de RFLP, se descubrió que el locus del gen pi21 está ubicado entre los marcadores de RFLP G271 y G317 (figura 2A).

45 Para crear un mapa genético más preciso de la región de pi21, se usaron un total de 1014 muestras incluyendo las 229 muestras cruzadas mencionadas anteriormente y se usaron 643 muestras de la población BC1F4 de la progenie para seleccionar 27 muestras con recombinación cromosómica cerca del locus de pi21, usando los marcadores de RFLP RA3591 y 13S1 ubicados a ambos lados del locus de pi21 (figura 2B). Además, se llevó a cabo una búsqueda usando 2703 muestras de la población F2, que se obtuvo mediante el cruzamiento de una línea que tenía el contexto genético de la variedad de arroz con cáscara japonesa y el alelo de susceptibilidad de la variedad de arroz con cáscara india *Kasalath* con una línea que tenía el alelo de resistencia de *Owarihatamochi*. Se seleccionaron 24 muestras con recombinación cromosómica cerca del locus de pi21 usando los marcadores de PCR 14T1 y 4S1 ubicados a ambos lados del locus de pi21. Además, usando esas muestras, se creó un mapa de ligamiento detallado utilizando los marcadores de ADN producidos en los siguientes procedimientos.

[Ejemplo 2] Alineación de clones de cromosomas artificiales derivados de P1 (PAC) en la región del gen pi21

Usando el mapa de alineación de clones de PAC de *Nipponbare* producidos en el programa de investigación del genoma del arroz, se identificaron clones de PAC que comprendían las secuencias de nucleótidos de los marcadores de ADN RA3591 y C975 situadas cerca del locus del gen pi21 (figura 2C). Además, se aislaron fragmentos terminales de los clones de PAC identificados P479G02, P415D09, P473G08, P703E11, P434F09, P702D03, P419B08, P472G09 y P502G01 mediante el método del casete, y se alinearon los clones de PAC identificados. Como resultado, se descubrió que los clones de PAC P032D02, P678A02, P405D12, P689F04, P479G02, P415D09, P473G08, P703E11, P434F09 y P702D03 comprenden la región del gen pi21 (figura 2C).

[Ejemplo 3] Estrechamiento de la región candidata del gen pi21

Se clonaron los fragmentos terminales de los clones de PAC alineados en la región de pi21, y se usan los clones obtenidos como nuevos marcadores de RFLP o marcadores de CAPS para crear un mapa genético detallado. Como resultado, se descubrió que el locus del gen pi21 existe en la región genómica intercalada entre el marcador de SSCP Pa102484 y el marcador de SNP P702D3_#12. Por consiguiente, se reveló que el locus del gen pi21 está ubicado en la región genómica de aproximadamente 25 kb intercalada entre los dos marcadores (figura 2D).

[Ejemplo 4] Identificación de la región genómica candidata mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos

Se determinó la secuencia de nucleótidos del clon de PAC P702D03 que se consideraba que comprendía el gen pi21, y se analizaron la secuencia de nucleótidos de la región genómica candidata de 25 kb en la variedad resistente *Owarihatamochi* y las variedades susceptibles *Aichi Asahi* y *Kasalath*. Se analizó la secuencia de nucleótidos usando los fragmentos de ADN que se amplificaron a partir de las tres variedades mencionadas anteriormente con cebadores diseñados utilizando la secuencia de la región candidata en *Nipponbare* y usando el método de terminador con colorante. Se estrechó adicionalmente la región candidata usando la información de polimorfismos de nucleótidos en la región génica candidata identificada mediante análisis de ligamiento. Como resultado, se mostró que el gen pi21 se segregaba conjuntamente con el marcador de STS P702D03_#79 (cebadores: 5'-AGA AGG TGG AGT ACG ACG TGA AGA-3' (SEQ ID NO: 8) y AGT TTA GTG AGC CTC TCC ACG ATT A-3' (SEQ ID NO: 9)), y se detectó uno recombinante entre los marcadores de SNP P702D03_#38 (cebadores: TTT TCC TGA GAA ATT TGT AAA GA-3' (SEQ ID NO: 12) y CGT CGA CGA TGA GGA TCT-3' (SEQ ID NO: 13)) y P702D03_#80 (cebadores: 5'-CTC CCA ATG TGT TTA GCA TC-3' (SEQ ID NO: 14) y 5'-CAA CCA TAT GTC CCT AAG GAT-3' (SEQ ID NO: 15)), respectivamente. Estos resultados mostraron que el gen pi21 está ubicado en la región genómica de aproximadamente 1,8 kb intercalada entre los marcadores de SNP P702D03_#38 y P702D03_#80 (figura 2D).

La secuencia de nucleótidos del gen Pi21 aislado derivado de arroz (*Oryza sativa* L, variedades *Aichi Asahi* y *Nipponbare*) se muestra en la SEQ ID NO: 1, la secuencia de nucleótidos de su ADNc se muestra en la SEQ ID NO: 2, y la secuencia de aminoácidos de la proteína ("la proteína Pi21") codificada por el ADNc se muestra en la SEQ ID NO: 3. Además, la secuencia de nucleótidos del gen Pi21 derivado de *Kasalath*, correspondiente al gen Pi21 de *Aichi Asahi* y *Nipponbare*, se muestra en la SEQ ID NO: 20, la secuencia de nucleótidos de su ADNc se muestra en la SEQ ID NO: 21, y la secuencia de aminoácidos de la proteína ("la proteína Pi21") codificada por el ADNc se muestra en la SEQ ID NO: 22.

[Ejemplo 5] Análisis de la secuencia de nucleótidos del gen candidato a pi21

Cuando se llevaron a cabo una predicción génica y una búsqueda de similitud para la secuencia de la región genómica candidata de 1,8 kb de la variedad *Nipponbare*, se descubrieron clones de ADNc de longitud completa de *Nipponbare* (AK106153, AK070581 y AK072320). Sin embargo, no estaban presentes genes parecidos en *Arabidopsis* o similares, y por tanto, no pudo predecirse la función del gen a partir de la homología. No obstante, un sitio de unión a metales en una posición alejada aproximadamente 10 aminoácidos del sitio de iniciación de la traducción predicho en este gen recuerda a un gen notificado en *Arabidopsis* (Hirayama *et al.*, 1999 Cell) con la función de una chaperona que porta un metal en el sistema de señalización de etileno. Puesto que de hecho cambia la sensibilidad a etileno en la línea casi isogénica AA-pi21 en comparación con *Aichi Asahi*, el sitio puede tener una función similar. Se diseñaron cebadores que pueden amplificar la parte correspondiente usando la información de secuencia de nucleótidos ya obtenida de *Nipponbare*, y se compararon las secuencias de nucleótidos de los productos de PCR y RT-PCR genómicos de las variedades susceptibles *Nipponbare* y *Aichi Asahi* con las de la variedad resistente *Owarihatamochi*. Como resultado, se encontraron mutaciones del ADN en dos sitios en la región de exón del gen en la variedad resistente en comparación con las variedades susceptibles. En la variedad resistente, se encontraron deleciones de 7 aminoácidos y 16 aminoácidos con relación a las variedades susceptibles, y se creía que estas mutaciones estaban asociadas con la progresión de manchas en el añublo que había infectado (figura 3).

La secuencia de nucleótidos del gen pi21 aislado se muestra en la SEQ ID NO: 4, la secuencia de nucleótidos de su ADNc se muestra en la SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el ADNc ("la proteína pi21") se muestra en la SEQ ID NO: 6.

[Ejemplo 6] Identificación de la función del gen candidato mediante transformación

(1) Introducción del gen de susceptibilidad en AA-pi21

Se incorporó un fragmento XbaI de 4,7 kb de la región genómica que incluye en 5' la región promotora predicha en el sentido de 5' de la variedad susceptible *Nipponbare*, identificada como candidato del gen pi21, en el vector pPZP2H-lac que puede transformarse mediante *Agrobacterium*. Se llevó a cabo la transformación mediante el método de Toki (Plant Mol. Biol. Rep. 15: 16-21, 1997) usando un vector en el que se había introducido este fragmento y un vector solo. Como la línea que iba a transformarse, se usó la línea casi isogénica para pi21 AA-pi21. Se obtuvieron 36 organismos resistentes a higromicina a partir del vector en el que se había introducido el fragmento XbaI de 4,7 kb, y se obtuvieron 12 organismos resistentes a higromicina a partir del vector solo. Se investigó si la región introducida se incorporaba o no, mediante el método de PCR usando cebadores (cadena homocodificada: 5'-GTA CGA CGT GAA GAA CAA CAG G-3' (SEQ ID NO: 16)) y (cadena antisentido: 5'-GCT TGG GCT TGC AGT CC 3' (SEQ ID NO: 17)) que eran específicos para el gen candidato. Como resultado, se descubrió que el gen candidato se incorporaba en todos los transformantes. Estos organismos se hicieron crecer en un invernadero aislado, y se inoculó el hongo del añublo (raza 007) en las progenies de líneas endogámicas. Como resultado, en los organismos en los que se introdujo el vector solo y los organismos T1 en los que no se suministró el gen introducido debido a segregación, se suprimió la progresión de manchas provocada por el añublo tal como se muestra en la línea casi isogénica AA-pi21, en comparación con la variedad susceptible *Aichi Asahi*. En cambio, en los organismos T1 en los que se había introducido el gen candidato, las manchas progresaron de forma más extensa (figura 4). Especialmente, aumentó el grado de sensibilidad en las líneas que tenían un alto número de copias del gen introducido.

(2) Introducción del gen de resistencia a una variedad susceptible

Por otro lado, se incorporó el fragmento XbaI de 4,7 kb de la variedad resistente *Owarihatamochi* en el vector de la misma manera, y se transformó la variedad susceptible *Aichi Asahi*. Se obtuvieron 56 organismos resistentes a higromicina a partir del vector en el que se había introducido el fragmento XbaI de 4,7 kb, y se obtuvieron 24 organismos resistentes a higromicina a partir del vector solo. De manera similar a (1), se investigó si la región introducida se incorporaba o no, mediante el método de PCR, y se descubrió que el gen candidato se incorporaba en todos los transformantes. Estos organismos se hicieron crecer en un invernadero aislado de la misma manera que en (1), y se inoculó el hongo del añublo (raza 007) en las progenies de líneas endogámicas. Como resultado, en los organismos en los que se había introducido el vector solo, los organismos T1 en los que no se suministró el gen introducido, y los organismos T1 en los que se había introducido el gen candidato, se observó la progresión del añublo en el mismo grado que en la variedad susceptible *Aichi Asahi*.

(3) Identificación de la función del gen candidato

A partir de los resultados anteriores, se descubrió que la región génica candidata de *Nipponbare* (XbaI de 4,7 kb) tiene la función de promover la formación de manchas en la línea casi isogénica AA-pi21, y por tanto, se evaluó que el gen candidato era el gen Pi21.

[Ejemplo 7] Mutaciones del gen candidato en arroz

Se buscaron mutaciones del gen candidato usando 79 variedades de arroz en el mundo. Como resultado, además de los tipos de mutación que se encuentran en *Nipponbare*, *Aichi Asahi* y *Owarihatamochi*, se encontraron diez tipos de mutaciones que tienen inserciones y/o deleciones en la región de exón. Estas mutaciones están definidas principalmente por la presencia o ausencia y el tamaño de una inserción/delección en los dos sitios de delección encontrados en *Owarihatamochi* en comparación con *Nipponbare* y *Aichi Asahi*. Debido a la similitud con la chaperona de molécula de metal propuesta en el sistema de señalización de etileno de *Arabidopsis thaliana*, se espera que esta región que no tiene homología con genes conocidos se una a otra molécula. Por tanto, las mutaciones en esta región pueden controlar delicadamente la eficacia de señalización y producir alteraciones funcionales.

A partir de los resultados anteriores, se encontró que el gen candidato estrechado mediante el método de clonación basada en mapa era el gen pi21 que suprime la progresión de manchas en la enfermedad del añublo del arroz. Este logro es el primer caso que prueba la función biológica de una resistencia cuantitativa en una planta. Se investigó la expresión del gen pi21 o el Pi21 mediante análisis de RT-PCR, y se encontró que cada gen se expresaba constitutivamente en todos los tejidos de la parte aérea. Por tanto, se espera que estos genes desempeñen un papel fundamental en el crecimiento de las plantas. Puesto que el cambio del número de copias conduce a cambios de fenotipo, la alteración del nivel de expresión y los tejidos en los que se expresan los genes mediante promotores puede ser un factor importante para la modificación funcional. Es decir, puede ser posible mejorar eficazmente la resistencia a la enfermedad que tienen originariamente las plantas, utilizando el gen pi21 aislado u otros alelos hallados en la especie.

Aplicabilidad industrial

Las características del gen Pi21 son especialmente adecuadas para producir variedades que tienen resistencia de campo al añublo en plantas. Hasta ahora, para conferir a plantas resistencia de campo al añublo, era necesario

5 cruzar una variedad que originariamente tiene resistencia de campo y características inferiores con una variedad que no tiene resistencia de campo pero que tiene muchas características superiores, y seleccionar de sus progenies, plantas que tienen excelente resistencia de campo así como otras características excelentes. Sin embargo, la evaluación precisa de la resistencia de campo requiere un gran esfuerzo. Además, cuando no está clara la posición exacta en el cromosoma del gen que confiere esta resistencia, es difícil seleccionar este gen de manera eficaz y precisa e introducirlo en una variedad con un gran uso práctico. De hecho, esto no había tenido éxito hasta ahora.

10 La presente descripción proporciona la posición cromosómica y la estructura del gen implicado en la resistencia de campo. Por tanto, se volvió posible conferir de manera eficaz a plantas resistencia de campo. También se volvió posible cultivar variedades que tienen resistencia y características sumamente prácticas cambiando la especificidad de tejido de la expresión y el nivel de expresión del gen que participa en la resistencia de campo. Por consiguiente, los genes descritos son útiles para realizar una agricultura muy práctica y altamente segura. Además, se espera que las plantas producidas mediante los métodos descritos, por ejemplo, proporcionen de manera estable un alto rendimiento cuando se trata de plantas útiles para la agricultura, y también adquiere un nuevo valor estético cuando se trata de plantas ornamentales.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGROBIOLÓGICAS

<120> Gen Pi21 de susceptibilidad al añublo del arroz, gen de resistencia pi21 y usos de los mismos

<130> EP55860FZ163pau

<140> EP 06 757 079.6

5 <141> 06-06-2006

<150> PCT/JP2006/311341

<151> 06-06-2006

<150> JP 2005-187867

<151> 28-06-2005

10 <160> 27

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 4817

<212> ADN

15 <213> *Oryza sativa*

<400> 1

ES 2 369 261 T3

ctagatgatg	ctttatgtga	aggcaataaa	tgataattaa	gtgtaataata	atgtattttt	60
taaacatcgt	agtgaagtcc	catttctagt	acgtaatgga	tcgaaatggg	gagggactgc	120
ttctctttta	gaaaaaaaaa	atgtaaaatt	gagatgagct	tttataagac	atgtaaggcc	180
atatgtctag	tgtaagtatg	atgctagcaa	gcacatttta	gcatcttaaa	ataaaaagca	240
agcacattaa	tatttttagga	gtagcatgg	atgcaataca	gtagaagagg	agatgccaac	300
aaaaaagaat	atggaaaatt	tgtttcatac	catcaaaagt	tcctgtgttt	tgctttatac	360
catcagcgtt	tgtgggtgac	tttaacacca	tccaaagttt	gctccgttac	ctatctactc	420
cacgaaatgt	gcttgctagc	atggatgaaa	aagtaaccga	aacaaacagt	tgtgggtatac	480
tcctaagtaa	tcctaagtag	ccaccggatt	caatacttta	ttctcaatcg	tccttctagt	540
ctattcccaa	ttatatgggt	ttgaccggtt	acaacgtacg	gacatgttac	tagcgttaagg	600
aaagagatgg	tttctgaaag	agtttttttt	ttccaacagt	cctaccaaat	ctatagcgtc	660
agacaagaaa	gcgaaagcta	aacctatatt	tattaccgta	atggtgcaaa	cttaatatta	720
cctgcaatag	acatgcccta	acatggtttc	aggaccacaa	accagagctc	taaaattccg	780
agcacatggt	cagaatatat	atacattttt	aattcccttc	tatactactc	caacttacct	840
ctatggaggt	aagaggctaa	aattgaaact	agataactga	atgttcttat	atttttccta	900
ataaaaaatat	aattgctcct	ttcattttaat	acttatatca	caacatgtag	ccatatgagc	960
caaaaactgta	ttagccatat	tttagcgaat	aaggctcaat	gcgattctgt	gtctgagctc	1020
tggcctgaaa	attcttgtaa	ctttatctca	catatgggtg	gtgaggaagc	ttctcatgag	1080
taatatattc	cctatttccc	cgcaaaaaaa	aaaacttata	tcacaacaaa	aatggaaaag	1140
accaacactg	agtattgtag	aagctagtac	ttttggcaaa	tgtgccccgaa	gatccccaaa	1200
acagtttggtg	gcataattca	gaagattggt	agctcagaaa	tcatttcaga	ctaggatatt	1260

gccgacacat cagagttctc gtgtaatcac gaagcaagga actgtacagt gcagtgatga 1320
 tatacaacta taggagagga cgaactgata ctgacggatg ctgtgtgtaa aatatctctg 1380
 taaaatcagg aatactggga gactgattgg atgatagggt tatacgggtca caatcatctc 1440
 gttaaacaca cttttcatta aagaggaatt accaaataca gtaattgatt cgacggtgcc 1500
 gcgagaaatg tgctatatat aaatgctcac ctatatattg gcagattagt taatttcagg 1560
 aattttccac agagaaagct aaatgagtg ctaaatgagtc gcattgcgta ctactacaag 1620
 ggtccaaaca gaaattgata tctgaaatta gcttttctta agataacaat gatatttttt 1680
 tttattgaag cacaaggtgt gcctgaaatc gaattctgaa aggtattctt atttttcaga 1740
 ggaaaatgta cagtgggtacc attctgaaag ctaattgaga gatgacaagg cgtgagaagg 1800
 accaaactgt cctatataca tgtgggtcatt ttccatctct tgcaatagggt tatcaagacc 1860
 cctcctgaaa catggaccgt ccagatgcga tccgacggac gaaaaaaacc aatggcagaa 1920
 tatttcaggc tctggcatat ccaaacataa ataagtaaca taaggttcag ctctgctcca 1980
 tccatgcatc gcctccatta ttcattgctt gattctccat gctttctctt actgctcatt 2040
 ggtaacattc ggcaaatttg acaggtgagc tcagtatttt aaatcttaat gtagtacttt 2100
 ggtgtgctaa tctttgctct gttcaaaaga gaattctggt ttctttgcta ttttgaaaag 2160
 agaattttcg ttacaggact tcaacttcca taactctttt ttttataatt aaggcatgat 2220
 atatatcttc tttctgaatt ccacgggaat tgcacttttt cctgagaaat ttgtaaagag 2280
 catgcctgtt aattgcaagg ggcccctaac tctgttatga gaaaagagaa ctatataaga 2340
 tgctcaataa gcacctcttt ttttttttct gttaactgac caaagcctgt ctatctgcat 2400
 tttttttgt tttttgtttt tcttgtgtgc agatgggtat attggtcac ttggtggacc 2460
 tgcaatgctg ccgctgcgat gccaaagatca ggaaggtcct gggctgcctt gaaggtataa 2520
 taaattctgc ccgaatcgtc catgtttgat tgaattttca aggctaatca gcagtgttcc 2580
 tgctcaattg ggagcaaaac ctctgttaaa aaggggtgtgt ttgaatgaat ataattgaat 2640
 atgaacgcag aggagtactg catcgagaag gtggagtacg acgtgaagaa caacaggggtg 2700
 atcgtgcgcg ggaagttcga cccggagaag ctgtgcaaga agatctgggt caaggccggc 2760
 aagatcatca aggagatcct catcgtcgac gtctggccgc cgcctgctgc gcagccgccg 2820
 ccgccgtgca agccgccgcc gtgcgagaag cctccggagg actgcaagcc caagccctgc 2880
 cattgctgca gctgcgagaa gcccaagccc aagcccaagc cctgccactg cgagaagccc 2940
 aagccctgtc actgcgagaa gcccaagcca tgcgagaagc cgccgccgtg caagccggag 3000
 gagccgccga agccgccgcc ggagaagccg ccgccgaagc cggagtgcaa gctggtgccg 3060
 tacccttacc cgggtgccgta cccgtacgcc gggcagtggt gctgccccaa gcctgagccg 3120
 ccgaagccgc cgccggagcc accgaaggag ccggagccgc cgaagccgtg cgggtgctcg 3180
 cacgccttcg tgtgcgtctg caagccggcg ccgccgccgc cgccgccgtg cgggtgctcg 3240
 gggggccacg ggaactgcgg ctgctggcatc aggccgtggc cgccgcaggt gtggccgccg 3300

ES 2 369 261 T3

ccgcccgtct gcccgccgcc gccgtggtgc tacaccgagg acaacgccaa cgcttgctcc 3360
 atcatgtgat ggccggccgg cggtcggcgt cgatcacgat catctctgct gcttaatttc 3420
 cttgcttgct actacctctg ctctttctct tgcctcggaa atcggataa attaaacacg 3480
 aggctgatcg atgtgtttgt aattaatcca tgggtgtttgt gttgtgtgct gtgtgggctg 3540
 tataataatt aattacagta tgttcatgta aatttgtttg tttgtttggt tatgttgttc 3600
 gatatgtata attatgtaca ataattaatc gtggagaggc tactaaact cataaactgt 3660
 agagtatctt ggctgtaaaa gtgtggcaat ttatcttttt cttgtgttag cattggctac 3720
 aaatagtttt tggccgtctt ttctcttcgt ttctcccctt ctttatgaga ttaattgtgt 3780
 gctgacctag atcaaattat agcgcgctga cctagtttta ttgtaactgc tcttatggat 3840
 gtctgctaac accatcaaac atgattaccg tggatatatt gtcttaatta ctactaacta 3900
 ggactaccta ggggcaccct tgcataatgt tttttttcga acgaccagat agatttgagt 3960
 catttgacta gcgttatatt aataggaggg aaaaaaata caaagtaca atatccaaca 4020
 ggccgagaaa agagaaaaaa aactgtacat gcctacgtgc aaacaagatt gcacgaagct 4080
 ctctcactc ctcatggcaa cattctccca atgtgtttag catcgaaaat accccaccaa 4140
 cctcgtcttg gatgtgactg gtcatttggg gtattgtcgc ctcttttcc ctctgaagat 4200
 tcttacgttc cattccttcc aaatttccta ggcgatgagc aagaaaagag atctgagccc 4260
 tttttgttta gttacttcca agtcgcttgt tccttggtgc caccaatgca agaggtttct 4320
 actgtcattc catttcagaa taagccaatt gagaactcca aaccagattt acttcgaaac 4380
 caggcattcg aacataaggt ggtcgacaat gtcgagattc cggattagca gagttatttg 4440
 gtttgagagt cacattccta caaccaatag aaaaccatcc tatggaccat ttagatagtg 4500
 tcctagtatt tgcttttata tttgctataa atattcttcc tttattgttt ttggagttca 4560
 caaacttaat aatcaaactt tgtgattttt taatttccat taacgaattc aaggaaccac 4620
 ctttatctct catcttcatt gcacactact gatttcttcc atccttaggg acatattggtt 4680
 gatacggaga ctgtttttct atcattatct aaaaaaatc taaggggcat atatatttg 4740
 tgttttctct cattcatgca tttcgcactt ttccctattc gtgaaatacc atttcccaca 4800
 tgagtgcaat gtttctt 4817

<210> 2

<211> 801

<212> ADN

5 <213> *Oryza sativa*

<400> 2

ES 2 369 261 T3

```

atgggtatat tggatcatctt ggtggacctg caatgctgcc gctgcatgac caagatcagg      60
aaggtccttg gctgccttga agaggagtac tgcacgaga aggtggagta cgacgtgaag      120
aacaacaggg tgatcgtgcg cgggaagttc gaccggaga agctgtgcaa gaagatctgg      180
tgcaaggccg gcaagatcat caaggagatc ctcatcgtcg acgtctggcc gccgccgtg      240
ccgcagccgc cgccgccgtg caagccgccg ccgtgagaga agcctccgga ggactgcaag      300
cccaagccct gccattgctg cagctgagag aagcccaagc ccaagccaa gccctgccac      360
tgcgagaagc ccaagccctg tcaactgagag aagcccaagc catgagagaa gccgccgccg      420
tgcaagccgg aggagccgcc gaagccgccg ccggagaagc cgccgccgaa gccggagtgc      480
aagctgggtg cgtaccctta cccgggtgccg taccctgacg ccgggcagtg gtgctgcca      540
aagcctgagc cgccgaagcc gccgccggag ccaccgaagg agccggagcc gccgaagccg      600
tgcgggtgct cgcacgcctt cgtgtgctc tgcaagccgg cgccgccgcc gccgccgccg      660
tgcgggtgct cggggggcca cgggaactgc ggctgaggca tcaggccgtg gccgccgag      720
gtgtggccgc cgccgccgtg ctgcccgccg ccgccgtggt gctacaccga ggacaacgcc      780
aacgcctgct ccatcatgtg a                                     801

```

<210> 3

<211> 266

5 <212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<400> 3

Met Gly Ile Leu Val Ile Leu Val Asp Leu Gln Cys Cys Arg Cys Asp
1 5 10 15

Ala Lys Ile Arg Lys Val Leu Gly Cys Leu Glu Glu Glu Tyr Cys Ile
20 25 30

Glu Lys Val Glu Tyr Asp Val Lys Asn Asn Arg Val Ile Val Arg Gly
35 40 45

Lys Phe Asp Pro Glu Lys Leu Cys Lys Lys Ile Trp Cys Lys Ala Gly
50 55 60

Lys Ile Ile Lys Glu Ile Leu Ile Val Asp Val Trp Pro Pro Pro Leu
65 70 75 80

Pro Gln Pro Pro Pro Cys Lys Pro Pro Pro Cys Glu Lys Pro Pro
85 90 95

Glu Asp Cys Lys Pro Lys Pro Cys His Cys Cys Ser Cys Glu Lys Pro
100 105 110

Lys Pro Lys Pro Lys Pro Cys His Cys Glu Lys Pro Lys Pro Cys His
115 120 125

Cys Glu Lys Pro Lys Pro Cys Glu Lys Pro Pro Pro Cys Lys Pro Glu
130 135 140

Glu Pro Pro Lys Pro Pro Pro Glu Lys Pro Pro Pro Lys Pro Glu Cys
145 150 155 160

Lys Leu Val Pro Tyr Pro Tyr Pro Val Pro Tyr Pro Tyr Ala Gly Gln
165 170 175

Trp Cys Cys Pro Lys Pro Glu Pro Pro Lys Pro Pro Pro Glu Pro Pro
180 185 190

Lys Glu Pro Glu Pro Pro Lys Pro Cys Gly Cys Ser His Ala Phe Val
195 200 205

Cys Val Cys Lys Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Cys Gly Cys Ser
210 215 220

Gly Gly His Gly Asn Cys Gly Cys Gly Ile Arg Pro Trp Pro Pro Gln
225 230 235 240

Val Trp Pro Pro Pro Pro Val Cys Pro Pro Pro Pro Trp Cys Tyr Thr
245 250 255

Glu Asp Asn Ala Asn Ala Cys Ser Ile Met
260 265

<210> 4

<211> 4745

ES 2 369 261 T3

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<400> 4

```

ctagatgatg ctttatgtga aggcaataaa tgataattaa gtgtaatata atgtatTTTT    60
taaacatcgt agtgaagtcc catttctagt acgtaatgga tcgaaatggg gagggactgc    120
ttctctTTTA gaaaaaaaaat gtaaaattga gatgagcttt tataagacat gtaaggccat    180
atgtcttagtg taagtatgat gctagcaagc acatttttagc atcttaaaat aaaaagcaag    240
cacattaata ttttaggagt tagcatggat gcaatacagt agaagaggag atgccaacaa    300
aaaagaatat ggaaaatttg tttcatacca tcaaaagttc ctgtgttttg ctttatacca    360
tcagcgtttg tgggtgtactt taacaccatc caaagtttgc tccgttacct atctactcca    420
cgaaatgtgc ttgctagcat ggatgaaaaa gtaaccgaaa caaacagttg tggatatactc    480
ctaagtaatc ctaagtagcc accggattca atactttatt ctcaatcgtc cttctagtct    540
attccaatt atatggggtt gacccgttac aacgtacgga catgttacta gcgtaaggaa    600
agagatgggt tctgaaagag tttttttttt ccaacagtcc tacccaatct atagcgttag    660
acaagaaagc gaaagctaaa cccatattta ttaccgtaat gttgcaaact taatattacc    720
tgcaatagac atgccctaac atggtttcag gaccacaaac cagagctcta aaattccgag    780
cacatgttca gaatatatat acatttttaa ttcccttcta tactactcca acttacctct    840
atggaggtaa gaggctaaaa ttgaaactag ataactgaat gttcttatat ttttcctaatt    900
aaaaatataa ttgctccttt catttaatac ttatatcaca acatgtagcc atatgagcca    960
aaactgtatt agccatattt tagcgaataa ggctcaatgc gattctgtgt ctgagctctg   1020
gcctgaaaat tcttgtaact ttatctcaca tatgggtgtgt gaggaagctt ctcatgagta   1080
atatattccc tatttccccg caaaaaaaaaa aacttatatc acaacaaaaa tggaaaagac   1140

```

caacactgag	tattgtagaa	gctagtactt	ttggcaaatg	tgcccgaaga	tccccaaaac	1200
agtttgtggc	ataattcaga	agattgttag	ctcagaaatc	atrtcagact	aggatattgc	1260
cgacacatca	gagttctcgt	gtaatcacga	agcaaggaac	tgtacagtgc	agtgatgata	1320
tacaactata	ggagaggacg	aactgatact	gacggatgct	gtgtgtaaaa	tatctctgta	1380
aaatcaggaa	tactgggaga	ctgattggat	gataggttta	tacggtcaca	atcatctcgt	1440
taaacacact	tttcattaaa	gaggaattac	caaatacagt	aattgattcg	acggtgccgc	1500
gagaaatgtg	ctatatataa	atgctcacct	atatttgggc	agattagtta	atrtcaggaa	1560
ttttccacag	agaaagctaa	atgagtgcta	aatgagtcgc	attgctgact	actacaaggg	1620
tccaaacaga	aattgatatc	tgaaattagc	ttttcttaag	ataacaatga	tatttttttt	1680
tattgaagca	caaggtgtgc	ctgaaatcga	attctgaaag	gtattcttat	ttttcagagg	1740
aaaatgtaca	gtggtaccat	tctgaaagct	aattgagaga	tgacaaggcg	tgagaaggac	1800
caaactgtcc	tatatacatg	tggtcatttt	ccatctcttg	caataggtta	tcaagacccc	1860
tcctgaaaca	tggaccgtcc	agatgcatc	cgacggacga	aaaaaaccaa	tggcagaata	1920
tttcaggctc	tggcatatcc	aaacataaat	aagtaacata	aggttcagct	ctgctccatc	1980
catgcatcgc	ctccattatt	catgcttcga	ttctccatgc	tttcctctac	tgctcattgg	2040
taacattcgg	caaatttgac	aggtgagctc	agtattttta	atcttaatgt	agtactttgg	2100
tgtgctaatc	tttgctctgt	tcaaaagaga	attctggttt	ctttgctatt	ttgaaaagag	2160
aattttcgtt	acaggacttc	aacttcata	atactttttt	ttataattaa	ggcatgatat	2220
atatcttttt	tctgaattcc	acgggaattg	cactttttcc	tgagaaattt	gtaaagagca	2280
tgctgttaa	ttgcaagggg	cccctaactc	tgttatgaga	aaagagaact	atataagatg	2340
ctcaataagc	acctcttttt	tttttctgt	taactgacca	aagcctgtct	atctgcattt	2400
ttttttgttt	tttgtttttc	ttgtgtgcag	atgggtatat	tggctatctt	ggtggacctg	2460
caatgctgcc	gctgcatgac	caagatcagg	aaggctctgg	gctgccttga	aggtataata	2520
aattctgccc	gaatcgtcca	tgtttgattg	aattttcaag	gctaatcagc	agtgttcctg	2580
ctcaattggg	agcaaaacct	ctgttaaaaa	gggtgtgttt	gaatgaatat	aattgaatat	2640
gaacgcagag	gagtactgca	tcgagaaggt	ggagtacgac	gtgaagaaca	acagggatgat	2700
cgtgctggg	aagtctgacc	cggagaagct	gtgcaagaag	atctggtgca	aggccggcaa	2760
gatcatcaag	gagatcctca	tcgtcgacgt	ctggccgccc	ccgtgcaagc	cgccgcccgtg	2820
cgagaagcct	ccggaggact	gcaagcccaa	gccctgccat	tgctgcagct	gagagaagcc	2880
caagcccaag	cccaagccct	gccactgcca	gaagcccaag	ccctgtcact	gagagaagcc	2940
caagccatgc	gagaagccgc	cgccgaagcc	ggagtgcaag	ctggtgccgt	acccttacc	3000
ggtgccgtac	ccgtacgccg	ggcagtgggtg	ctgccc aaag	cctgagccgc	cgaagccgcc	3060
gccggagcca	ccgaaggagc	cggagccgcc	gaagccgtgc	gggtgctcgc	acgccttcgt	3120
gtgctctg	aagccggcgc	cgccgcccgc	gccgcccgtgc	gggtgctcgg	ggggccacgg	3180
gaactgcggc	tgccgcatca	ggccgtggcc	gccgcagggtg	tgccgcccgc	cgccgctctg	3240

ES 2 369 261 T3

cccgccgccg ccgtggtgct acaccgagga caacgccaac gcctgctcca tcatgtgatg 3300
 gccggccggc ggccggcgtc gatcacgacg atctctgctg ctttaattcc ttgcttgcta 3360
 ctacctctgc tcctttcctt gcctcggaaa tcggaataaa ttaaaccacga ggctgatcga 3420
 tgtgtttgta attaatccat ggtgtttgtg ttgtgtgctg tgtgggctgt ataataatta 3480
 attacagtat gttcatgtaa atttgtttgt ttgtttgctt atgttgctcg atatgtataa 3540
 ttatgtacaa taattaatcg tggagaggct cactaaactc ataaactgta gagtatcttg 3600
 gctgtaaaag tgtggcaatt tatctttttc ttgtgttagc attggctaca aatagttttt 3660
 ggccgtcttt tctcttcgct tctccccctc tttatgagat taattgtgtg ctgacctaga 3720
 tcaaattata gcgcgctgac ctagttttat tgtaactgct cttatggatg tctgctaaca 3780
 ccatcaaaca tgattaccgt ggtatatttg tcttaattac tactaactag gactacctag 3840
 gggcacctt gcatatgttt ttttttcgaa cgaccagata gatttgagtc atttgactag 3900
 cgttatatta ataggaggga aaaaaataca aagtacaaat atccaacagg ccgagaaaag 3960
 agaaaaaaaa ctgtacatgc ctacgtgcaa acaagattgc acgaagctct cctcactcct 4020
 catggcaaca ttctccaat gtgttttagca tcgaaaatac cccaccaacc tcgtcttgga 4080
 tgtgactggt catttggtgt attgtcgcct ccttttcctt ctgaagattc ttacgttcca 4140
 ttccttccaa atttcctagg cgatgagcaa gaaaagagat ctgagccctt tttgtttagt 4200
 tacttccaag tcgcttgctt cttgtgtcca ccaatgcaag aggtttctac tgtcattcca 4260
 tttcagaata agccaattga gaactccaaa ccagatttac ttcgaaacca ggcattcgaa 4320
 cataagggtg tcgacagtgt cgagattccg gattagcaga gttatttggg ttgagagtca 4380
 cattcctaca accaatagaa aaccatccta tggaccattt agatagtgtc ctagtatttg 4440
 cttttatatt tgctataaat attcttcctt tattgttttt ggagttcaca aacttaataa 4500
 tcaaactttg tgatttttta atttcatta acgaattcaa ggaaccacct ttatctctca 4560
 tcttcattgc aactactga tttctttcat ccttagggac atatggttga tacggagact 4620
 gtttttctat cattatctaa aaaaaatcta aggggcatat atatattgtg tttctctca 4680
 ttcatgcatt tcgcactttt ccctattcgt gaaataccat tcccacatg agtgcaatgt 4740
 ttctt 4745

<210> 5

<211> 732

<212> ADN

5 <213> *Oryza sativa*

<400> 5

atgggtatat tggatcattt ggtggacctg caatgctgcc gctgcatgca caagatcagg 60
 aaggctcctg gctgccttga agaggagtac tgcacgaga aggtggagta cgacgtgaag 120
 aacaacaggg tgatcgtgca cgggaagttc gaccgggaga agctgtgcaa gaagatctgg 180
 tgcaaggccg gcaagatcat caaggagatc ctcatcgtcg acgtctggcc gccgccgtgc 240
 aagccgccgc cgtgcgagaa gcctccggag gactgcaagc ccaagccctg ccattgctgc 300

```

agctgcgaga agcccaagcc caagcccaag ccctgccact gcgagaagcc caagccctgt      360
cactgcgaga agcccaagcc atgcgagaag ccgccgccga agccggagtg caagctggtg      420
ccgtaccctt acccggtgcc gtacccttac gccgggcagt ggtgctgccc aaagcctgag      480
ccgccgaagc cgccgccgga gccaccgaag gagccggagc cgccgaagcc gtgcggggtgc      540
tcgcacgcct tcgtgtgcgt ctgcaagccg gcgccgccgc cgccgccgcc gtgcggggtgc      600
tcggggggcc acgggaactg cggctgcggc atcaggccgt ggccgccgca ggtgtggccg      660
ccgccgcccg tctgcccgcc gccgccgtgg tgctacaccg aggacaacgc caacgcctgc      720
tccatcatgt ga                                                                732

```

<210> 6

<211> 243

<212> PRT

5 <213> *Oryza sativa*

<400> 6

```

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

```

ES 2 369 261 T3

Pro Cys Gly Cys Ser His Ala Phe Val Cys Val Cys Lys Pro Ala Pro
 180 185 190

Pro Pro Pro Pro Pro Cys Gly Cys Ser Gly Gly His Gly Asn Cys Gly
 195 200 205

Cys Gly Ile Arg Pro Trp Pro Pro Gln Val Trp Pro Pro Pro Pro Val
 210 215 220

Cys Pro Pro Pro Pro Trp Cys Tyr Thr Glu Asp Asn Ala Asn Ala Cys
 225 230 235 240

Ser Ile Met

<210> 7

<211> 975

<212> ADN

5 <213> *Oryza sativa*

<400> 7

gtacgacgtg aagaacaaca gggatgatcgt gcgcggaag ttcgaccgg agaagctgtg	60
caagaagatc tggtgcaagg ccggcaagat catcaaggag atcctcatcg tcgacgtctg	120
gccgccgccc ctgccgcagc cgccgccgc gtgcaagccg ccgccgtgcg agaagcctcc	180
ggaggactgc aagcccaagc cctgccattg ctgcagctgc gagaagccca agcccaagcc	240
caagccctgc cactgcgaga agcccaagcc ctgtcactgc gagaagccca agccatgcca	300
gaagccgccc ccgtgcaagc cggaggagcc gccgaagccg ccgccggaga agccgccgcc	360
gaagccggag tgcaagctgg tgccgtacc ttaccgggtg ccgtaccctg acgccgggca	420
gtggtgctgc ccaaagcctg agccgccgaa gccgccgccc gagccaccga aggagccgga	480
gccgccgaag ccgtgcccgt gctcgcacgc cttcgtgtgc gtctgcaagc cggcgcgcc	540
gccgccgccc ccgtgcccgt gctcgggggg ccacgggaac tgcggctgcg gcatcaggcc	600
gtggccgccc caggtgtggc cgccgccgcc cgtctgcccg ccgccgccgt ggtgctacac	660
cgaggacaac gcccaagcct gctccatcat gtgatggccg gccggcggtc ggcgtcgatc	720
acgatcatct ctgctgctta atttccttgc ttgctactac ctctgctcct ttccttgctt	780
cggaaatcgg aataaattaa acacgaggct gatcgtatgtg tttgtaatta atccatggtg	840
tttgtgtgtg gtgctgtgtg ggctgtataa taattaatta cagtatgttc atgtaaattt	900
gttgtttgt ttgtttatgt tgttcgatat gtataattat gtacaataat taatcgtgga	960
gaggctcact aaact	975

<210> 8

<211> 24

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

	<223> una secuencia de cebador sintetizado de manera artificial	
	<400> 8	
	agaaggtgga gtacgacgtg aaga	24
	<210> 9	
5	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizado de manera artificial	
10	<400> 9	
	agtttagtga gcctctccac gatta	25
	<210> 10	
	<211> 916	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Oryza sativa</i>	
	<400> 10	
	agaaggtgga gtacgacgtg aagaacaaca gggtgatcgt gcgcggaag ttcgacccgg	60
	agaagctgtg caagaagatc tgggtcaagg ccggcaagat catcaaggag atcctcatcg	120
	tcgacgtctg gccgccgccc tgcaagccgc cgccgtgcga gaagcctccg gaggactgca	180
	agcccaagcc ctgccattgc tgcagctgcy agaagcccaa gcccaagccc aagccctgcc	240
	actgcygagaa gcccaagccc tgtcactgcy agaagcccaa gccatgcygag aagccgcccgc	300
	cgaagccgga gtgcaagctg gtgcccgtacc cttaccgggt gccgtaccgc tacgcccgggc	360
	agtgggtgctg cccaaagcct gagccgcccga agccgcccgc ggagccaccg aaggagccgg	420
	agccgcccga gccgtgcygg tgctgcyacg ccttcgtgtg cytctgcaag ccggcgcgc	480
	cgccgcccgc gccgtgcygg tgctcggggg gccacgggaa ctgcygctgc ggcacaggc	540
	cytgggccc gcaggtgtgg ccgcccgc ccgtctgccc gccgcccgc tgggtgctaca	600
	ccgaggacaa ccccaagccc tgctccatca tgtgatggcc ggccggcggc cggcgtcgat	660
	cacgatcatc tctgctgctt aatttccttg cttgctacta cctctgctcc tttccttggc	720
	tcggaaatcg gaataaatta aacacgaggc tgatcgatgt gtttgaatt aatccatggt	780
	gtttgtgttg tgtgctgtgt gggctgtata ataattaatt acagtatggt catgtaaatt	840
	tgtttgtttg tttgtttatg ttgttcgata tgtataatta tgtacaataa ttaatcgtgg	900
	agaggctcac taaact	916
	<210> 11	
	<211> 295	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Oryza sativa</i>	

<400> 11

tggccggccg gcggtcggcg tcgatcacga tcatctctgc tgcttaattt ccttgcttgc 60
tactacctct gtcctttcc ttgcctcgga aatcggaata aattaaacac gaggctgatc 120
gatgtgtttg taattaatcc atggtgtttg tgttgtgtgc tgtgtgggct gtataataat 180
taattacagt atgttcatgt aaatttgttt gtttgtttgt ttatgttggt cgatatgtat 240
aattatgtac aataattaat cgtggagagg ctactaaac tcataaactg tagag 295

<210> 12

5 <211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizado de manera artificial

10 <400> 12

ttttcctgag aaatttgtaa aga 23

<210> 13

<211> 18

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizado de manera artificial

<400> 13

cgtcgacgat gaggatct 18

20 <210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> una secuencia de cebador sintetizado de manera artificial

<400> 14

ctcccaatgt gtttagcatc 20

<210> 15

<211> 21

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

	<223> una secuencia de cebador sintetizado de manera artificial	
	<400> 15	
	caaccatatg tccctaagga t	21
	<210> 16	
5	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizado de manera artificial	
10	<400> 16	
	gtacgacgtg aagaacaaca gg	22
	<210> 17	
	<211> 17	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizado de manera artificial	
	<400> 17	
	gcttgggctt gcagtcc	17
20	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> una secuencia de sonda sintetizada de manera artificial	
	<400> 18	
	ctgccgcagc cgccgccgcc g	21
	<210> 19	
	<211> 48	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de sonda sintetizada de manera artificial	
	<400> 19	
35	tgcaagccgg aggagccgcc gaagccgccg ccggagaagc cgccgccg	48

ES 2 369 261 T3

<210> 20

<211> 4803

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

5 <400> 20

tctagatgat gctttatgtg aaggcaataa atgataatta agtgtaatat aatgtatfff	60
ttaaaccatcg tagtgaagtc ccatttctag tacgtaatgg atcgaaatgg ggagggactg	120
cttctctfff agaaaaaat gtaaaattga gatgagctff tataagacat gtaaggccat	180
atgtctagtg taagtatgat gctagcaagc acattfftagc atcttaaaat aaaaggcaag	240
cacattaata tfftaggagt tagcatggat gcaatacagt agaagaggag atgccaacaa	300
aaaagaatat ggaaaatttg tffcatacca tcaaaagffc ctgtgffffg cffftatacca	360
tcagcgtffg tgggtgtactt taacaccatc caaagffffg tccgffacct atccactcca	420
cgaaatgtgc ttgctagcat ggatgaaaaa gtaaccgaaa caaacagffg tggatatactc	480
ctaagtaatc ctaagtagcc accggattca atactfffatt ctcaatcgtc cffctagtct	540
attcccaatt atatgggfff gacccgffac aacgtacggg catgffacta gcgtaaggaa	600
agagatggff tctaaaagag tffftfffff ccaacagffc taccfaatct atagcgctag	660
acaagaaagc gaaagctaaa cccatattta ttaccgfaat gffgcaaact taatattacc	720
tgcaatagac atgccctaac atggffffcag gaccacaaac cagagctcta aaattccgag	780
cacatgffca gaatatatat acattffftaa tffcctffcta tactactcca acttacctct	840
atggaggtaa gaggctaaaa ttgaaactag ataactgfaat gffctffatat tfffcctaat	900
aaaaatataa ttgctcctff catttaatac ttatatcaca acatgtagcc atatgagcca	960
aaactgtatt agccatattt tagcgaataa ggctcaatgc gattctgtgt ctgagctctg	1020

gcctgaaaat tcttgtaact ttatctcaca tatgatgtgt gaggaagctt ctcatgagta 1080
 atatattccc tatttccccg caaaaaaaaaa acttatatca caacaaaaat ggaaaagacc 1140
 aacactgagt attgtagaag ctagtacttt tggcaaagt gcccgaagat ccccaaaaca 1200
 gtttgtaggca taattcagaa gattgttagc tcagaaatca tttcagacta ggatattgcc 1260
 gacacatcag agttctcgtg taatcaagaa gcaaggaact gtacagtgca gtgatgatat 1320
 acaactatag gagaggacga actgatactg acggatgctg tgtgtaaaat atctctgtaa 1380
 aatcaggaat actgggagac tgattggatg atagatttat acggtcacaa tcatctcgtt 1440
 aaacacactt ttcattaaag aggaattacc aaatacagta attgattcga cggtgccgcg 1500
 agaaatgtgc tatatataaa tgctcaccta ttttgggca gattagttaa tttcaggaat 1560
 tttccacaga gaaagctaaa tgagtgctaa atgagtcgca ttgctgacta ctacaagggg 1620
 ccaaacagaa attgatattc gaaattagct tttcttaaga taacaatgat attttttttt 1680
 attgaagcac aagggtgtgcc tgaaatcgaa ttctgaaagg tattcttatt tttcagagga 1740
 aaatgtacac tgggtaccatt ctgaaagcta attgagagat gacaaggcgt gagaaggacc 1800
 aaactgtcct atatacatgt ggtcattttc catctcttgc aataggttat caagaccctt 1860
 cctgaaacat ggaccgtcca gatgcatcc gacggacgaa aaaaaccaat ggcagaatat 1920
 ttcaggctct ggcataatcca aacataaata agtaacataa ggttcagctc tgctccatcc 1980
 atgcattgcc tccattattc atgcttcgat tctccatgct ttcctctact gctcattggt 2040
 aacattcggc aaatttgaca ggtgagctca gtattttaaa tcttaatgta gtactttggt 2100
 gtgctaatac ttgctctggt caaaagagaa ttctggtttc tttgctattt tgaaaagaga 2160
 attttcgtta caggacttca acttccataa tacttttttt tataattaag gcatgatata 2220
 tatcttcttt ctgaattcca cgggaattgc actttttcct gagaaatttg taaagagcat 2280
 gcctgttaat tgcaagggggc ccctaactct gttatgagaa aagagaacta tataagatgc 2340
 tcaataagca cctctttttt ttttttgggt aactgaccaa agcctgtcta tctgcatttt 2400
 tttttgtttt ttgtttttct tgtgtgcaga tgggtatatt ggtcatctcg gtggacctgc 2460
 aatgctgccg ctgcatgcc aagatcagga aggtcctggg ctgccttgaa ggtataataa 2520
 attctgcccc aatcgtccat gtttgattga attttcaagg ctaatcagca gtgttctctgc 2580
 tcaattggga gcaaaacctc tgttaaaaag ggtgtgtttg aatgaatata attgaatatg 2640
 aacgcagagg agtactgcat cgagaagggt gagtacgacg tgaagaacaa cagggtgatc 2700
 gtgctgaggga agttcgacc ggagaagctg tgcaagaaga tctggtgcaa ggccggcaag 2760
 atcatcaagg agatcctcat cgtcgacgct tggccgcccgc cgtcgcgcc gccgtgcaag 2820
 ccgcccgggt gcgagaagcc tccggaggac tgcaagccca agccctgcca ttgctgcagc 2880
 tgcgagaagc ccaagcccaa gcccaagccc tgccactgct agaagcccaa gccctgtcac 2940
 tgcgagaagc ccaagccatg cgagaagccg ccgcccgtgca agccggagga gccgccgaag 3000
 ccgcccgggt agaagccgcc gccgaagccg gaggcaagc tgggtgccgta cccttaccgg 3060

gtgccgtacc cgtacgccgg gcagtgggtgc tgcccaaaagc ctgagccgcc gaagccgccg 3120
 ccggagccac cgaaggagcc ggagccgccg aagccgtgcg ggtgctcgca cgccttcgtg 3180
 tgcgtctgca agccggcgcc gccgccgccg ccgccgtgcg ggtgctcggg gggccacggg 3240
 aactgcggct gcggcatcag gccgtggccg ccgcaggtgt ggccgccgcc gcccgctctgc 3300
 ccgccgccgc cgtgggtgcta caccgaggac aacgccaacg cctgctccat catgtgatgg 3360
 ccggccggcg gccggcgctc atcacgatca tctctgctgc ttaatttcct tgcttgctac 3420
 tacctctgct cctttccttg cctcggaaat cggaataaat taaacacgag gctgatcgat 3480
 gtgtttgtaa ttaatccatg gtgtttgtgt tgtgtgctgt gtgggctgta taataattaa 3540
 ttacagtatg ttcattgtaa tttgtttgtt tgtttgttta tgttgttcga tatgtataat 3600
 tatgtacaat aattaatcgt ggagaggctc actaaactca taaactgtag agtatcttgg 3660
 ctgtaaaagt gtggcaattt atctttttct tgtgttagca ttggctacaa atagtttttg 3720
 gccgtctttt ctcttcgttt ctccccttct ttatgagatt aattgtgtgc tgacctagat 3780
 caaattatag cgcgctgacc tagttttatt gtaactgctc ttatggatgt ctgctaacat 3840
 catcaaacat gattaccgtg gtatatttgt ctttaattact actaactagg actacctagg 3900
 ggcacccttg catatgtttt ttttcgaacg accagataga tttgagtcatt ttgactagcg 3960
 ttatatattaat aggagggaaa aaatacaaaag tacaatatc caacaggccg agaaaagaga 4020
 aaaaaaactg tacgtgccta cgtgcaaaca agattgcacg aagctctcct cactcctcat 4080
 ggcaacattc tccaatgtg tttagcatcg aaaatacccc accaacctcg tcttggatgt 4140
 gattggatcat ttgggtgatt gtcgcctcct tttccctctg aagattctta tgttccattc 4200
 cttccaaatt tcctaggcga tgagcaagaa aagagatctg agcccttttt gtttagttac 4260
 ttccaagtcg cttgttcctt gtgtccacca atgtaagagg tttctactgt cattccattt 4320
 cagaataagc caattgagaa ctccaaacca gatttacttc gaaaccaggc attcgaatat 4380
 aagggtggtcg acagtctcga gattccggat tagcagagtt atttggtttg agagtcacat 4440
 tcctacaacc aatagaaaac catcctatgg accattttaga taatgtccta gtatttgctt 4500
 ttatatttgc tataaatatt cttcctttat tgtttttgga gttcacaac ttaataatca 4560
 aactttgtga ttttttaatt tccattaacg aattcaagga accacctta tctctcatct 4620
 tcattgcaca ctactgattt ctttcatcct tagggatata tggttgatac ggagactggt 4680
 tttctatcat tatctaaaaa aaaatctaag gggcatatat atattgtggt tctctcatt 4740
 catgcatttc gcacttttcc ctattcgtga aataccattt cccacatgag tgcaatgttt 4800
 ctt 4803

<210> 21

<211> 1014

<212> ADN

5 <213> *Oryza sativa*

ES 2 369 261 T3

<400> 21

atgggtatat	tggtcatctc	ggtggacctg	caatgctgcc	gctgcatgac	caagatcagg	60
aaggtcctgg	gctgccttga	agaggagtag	tgcatcgaga	aggtggagta	cgacgtgaag	120
aacaacaggg	tgatcgtgcg	cgggaagtgc	gacccggaga	agctgtgcaa	gaagatctgg	180
tgcaaggccg	gcaagatcat	caaggagatc	ctcatcgtcg	acgtctggcc	gccgccgtcg	240
ccgccgccgt	gcaagccgcc	gccgtgagag	aagcctccgg	aggactgcaa	gccaagccc	300
tgccattgct	gcagctgcga	gaagcccaag	ccaagccca	agccctgcca	ctgagagaag	360
ccaagccct	gtcactgcga	gaagcccaag	ccatgcgaga	agccgccgcc	gtgcaagccg	420
gaggagccgc	cgaagccgcc	gccggagaag	ccgccgccga	agccggagtg	caagctggtg	480
ccgtaccctt	acccggtgcc	gtaccctgac	gccgggcagt	ggtgctgccc	aaagcctgag	540
ccgccgaagc	cgccgccgga	gccaccgaag	gagccggagc	cgccgaagcc	gtgctgggtg	600
tcgcacgcct	tcgtgtgcgt	ctgcaagccg	gcgccgccgc	cgccgccgcc	gtgctgggtg	660
tcggggggcc	acgggaactg	cggctgcggc	atcaggccgt	ggccgccgca	ggtgtggccg	720
ccgccgcccg	tctgcccgcc	gccgccgtgg	tgctacaccg	aggacaacgc	caacgcctgc	780
tccatcatgt	gatggccggc	cggcggccgg	cgctgatcac	gatcatctct	gctgcttaat	840
ttccttgctt	gctactacct	ctgctccttt	ccttgccctg	gaaatcggaa	taaattaaac	900
acgaggctga	tcgatgtggt	tgtaattaa	ccatggtggt	tgtgtgtgtg	gctgtgtggg	960
ctgtataata	attaattaca	gtatgttcat	gtaaatttgt	ttgtttgttt	gttt	1014

<210> 22

5 <211> 263

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<400> 22

Met Gly Ile Leu Val Ile Leu Val Asp Leu Gln Cys Cys Arg Cys Asp
 1 5 10 15
 Ala Lys Ile Arg Lys Val Leu Gly Cys Leu Glu Glu Glu Tyr Cys Ile
 20 25 30
 Glu Lys Val Glu Tyr Asp Val Lys Asn Asn Arg Val Ile Val Arg Gly
 35 40 45
 Lys Phe Asp Pro Glu Lys Leu Cys Lys Lys Ile Trp Cys Lys Ala Gly
 50 55 60
 Lys Ile Ile Lys Glu Ile Leu Ile Val Asp Val Trp Pro Pro Pro Ser
 65 70 75 80
 Pro Pro Pro Cys Lys Pro Pro Pro Cys Glu Lys Pro Pro Glu Asp Cys
 85 90 95
 Lys Pro Lys Pro Cys His Cys Cys Ser Cys Glu Lys Pro Lys Pro Lys
 100 105 110
 Pro Lys Pro Cys His Cys Glu Lys Pro Lys Pro Cys His Cys Glu Lys

	115					120						125			
Pro	Lys 130	Pro	Cys	Glu	Lys	Pro 135	Pro	Pro	Cys	Lys	Pro 140	Glu	Glu	Pro	Pro
Lys 145	Pro	Pro	Pro	Glu	Lys 150	Pro	Pro	Pro	Lys	Pro 155	Glu	Cys	Lys	Leu	Val 160
Pro	Tyr	Pro	Tyr	Pro 165	Val	Pro	Tyr	Pro	Tyr 170	Ala	Gly	Gln	Trp	Cys 175	Cys
Pro	Lys	Pro	Glu 180	Pro	Pro	Lys	Pro	Pro 185	Pro	Glu	Pro	Pro	Lys 190	Glu	Pro
Glu	Pro	Pro 195	Lys	Pro	Cys	Gly	Cys 200	Ser	His	Ala	Phe	Val 205	Cys	Val	Cys
Lys	Pro 210	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro 215	Pro	Pro	Cys	Gly	Cys 220	Ser	Gly	Gly	His
Gly 225	Asn	Cys	Gly	Cys	Gly 230	Ile	Arg	Pro	Trp	Pro 235	Pro	Gln	Val	Trp	Pro 240
Pro	Pro	Pro	Val	Cys 245	Pro	Pro	Pro	Pro	Trp 250	Cys	Tyr	Thr	Glu	Asp 255	Asn
Ala	Asn	Ala	Cys 260	Ser	Ile	Met									

<210> 23

<211> 976

<212> ADN

5 <213> *Oryza sativa*

<400> 23

agaaggtgga gtacgacgtg aagaacaaca gggtgatcgt gcgcgggaag ttcgacccgg 60
 agaagctgtg caagaagatc tgggtgcaagg ccggcaagat catcaaggag atcctcatcg 120
 tcgacgtctg gccgcccggc tcgccggcgc cgtgcaagcc gccgccgtgc gagaagcctc 180
 cggaggactg caagcccaag ccctgccatt gctgcagctg cgagaagccc aagcccaagc 240
 ccaagccctg cactgcgag aagcccaagc cctgtcactg cgagaagccc aagccatgcg 300
 agaagccgcc gccgtgcaag ccggaggagc cgccgaagcc gccgccggag aagccgccgc 360
 cgaagccgga gtgcaagctg gtgccgtacc cttaccgggt gccgtaccgc tacgccgggc 420
 agtgggtgctg cccaaagcct gagccgcccga agccgcccgc ggagccaccg aaggagccgg 480
 agccgccgaa gccgtgcccg tgctcgcacg ccttcgtgtg cgtctgcaag ccggcgcggc 540
 cgccgcccgc gccgtgcccg tgctcggggg gccacgggaa ctgaggctgc ggcacagggc 600
 cgtggcccgc gcaggtgtgg ccgccgcccgc ccgtctgccc gccgccggcg tgggtgctaca 660
 ccgaggacaa cgccaacgcc tgctccatca tgtgatggcc ggccggcggc cggcgctgat 720

 cacgatcatc tctgctgctt aatttccttg cttgctacta cctctgctcc tttccttgcc 780
 tcggaaatcg gaataaatta aacacgaggc tgatcgatgt gtttgtaatt aatccatggt 840
 gtttggtgtg tgtgctgtgt gggctgtata ataattaatt acagtatggt catgtaaatt 900
 tgtttgtttg tttgtttatg ttgttcgata tgtataatta tgtacaataa ttaatcgtgg 960
 agaggctcac taaact 976

<210> 24

<211> 222

5 <212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<400> 24

tggccggccg gcggcccggc tcgatcacga tcatctctgc tgcttaattt ccttgcttgc 60
 tactacctt gctcctttcc ttgcctcgga aatcggaata aattaaacac gaggctgatc 120
 gatgtgtttg taattaatcc atgggtgtttg tgttggtgct tgtgtgggct gtataataat 180
 taattacagt atgttcatgt aaatttgttt gtttggtttg tt 222

<210> 25

10 <211> 12

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<400> 25

tgcgccggcg cg 12

15 <210> 26

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizado de manera artificial

5 <400> 26

gatcctcatc gtcgacgtct ggc

23

<210> 27

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizado de manera artificial

<400> 27

agggtacggc accagcttg

19

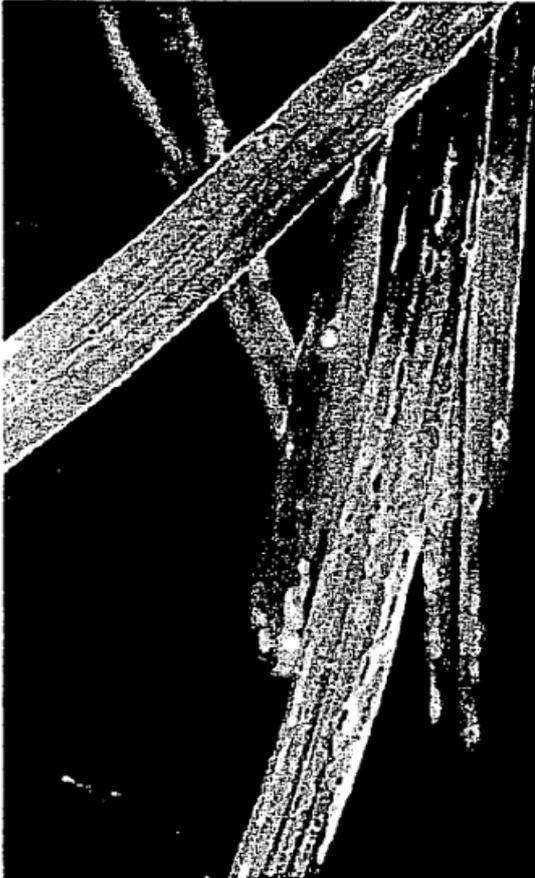
15

REIVINDICACIONES

1. Uso de un ADN de uno cualquiera de los siguientes (i) a (iv), para conferir a una planta de arroz resistencia de campo al añublo:
- 5 (i) un ADN que codifica un ARN complementario a un producto de transcripción del ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 ó 2;
- (ii) un ADN que codifica un ARN que tiene la actividad ribozima para escindir específicamente un producto de transcripción del ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 ó 2;
- (iii) un ADN que codifica un ARN que inhibe la expresión del ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 ó 2 mediante un efecto de cosupresión; y
- 10 (iv) un ADN que codifica un ARN que tiene actividad iARN para escindir específicamente un producto de transcripción del ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 ó 2.
2. Un vector que comprende el ADN de uno cualquiera de (i), (ii) y (iv) de la reivindicación 1.
3. Una célula transformada que comprende el ADN de uno cualquiera de (i), (ii) y (iv) de la reivindicación 1.
- 15 4. Una célula vegetal transformada que comprende el ADN de uno cualquiera de (i), (ii) y (iv) de la reivindicación 1.
5. Una planta transformada que comprende la célula transformada de la reivindicación 4.
6. Una planta transformada que es una progenie o clon de la planta transformada de la reivindicación 5, en la que dicha progenie o clon comprende el ADN de uno cualquiera de (i), (ii) y (iv) de la reivindicación 1.
- 20 7. Un material de propagación de la planta transformada de la reivindicación 5 ó 6, comprendiendo dicho material de propagación el ADN de uno cualquiera de (i), (ii) y (iv) de la reivindicación 1.
8. Un método para producir la planta transformada de la reivindicación 5 ó 6, que comprende la etapa de introducir en una célula vegetal el ADN de uno cualquiera de (i), (ii) y (iv) de la reivindicación 1, y luego regenerar una planta a partir de la célula vegetal.
- 25 9. Un método para conferir a una planta resistencia de campo al añublo, que comprende la etapa de expresar el ADN de la reivindicación 1 en una célula de la planta.

FIG. 1

AA-pi21
(RESISTENTE)



AICHI ASAHI
(SUSCEPTIBLE)



FIG. 2

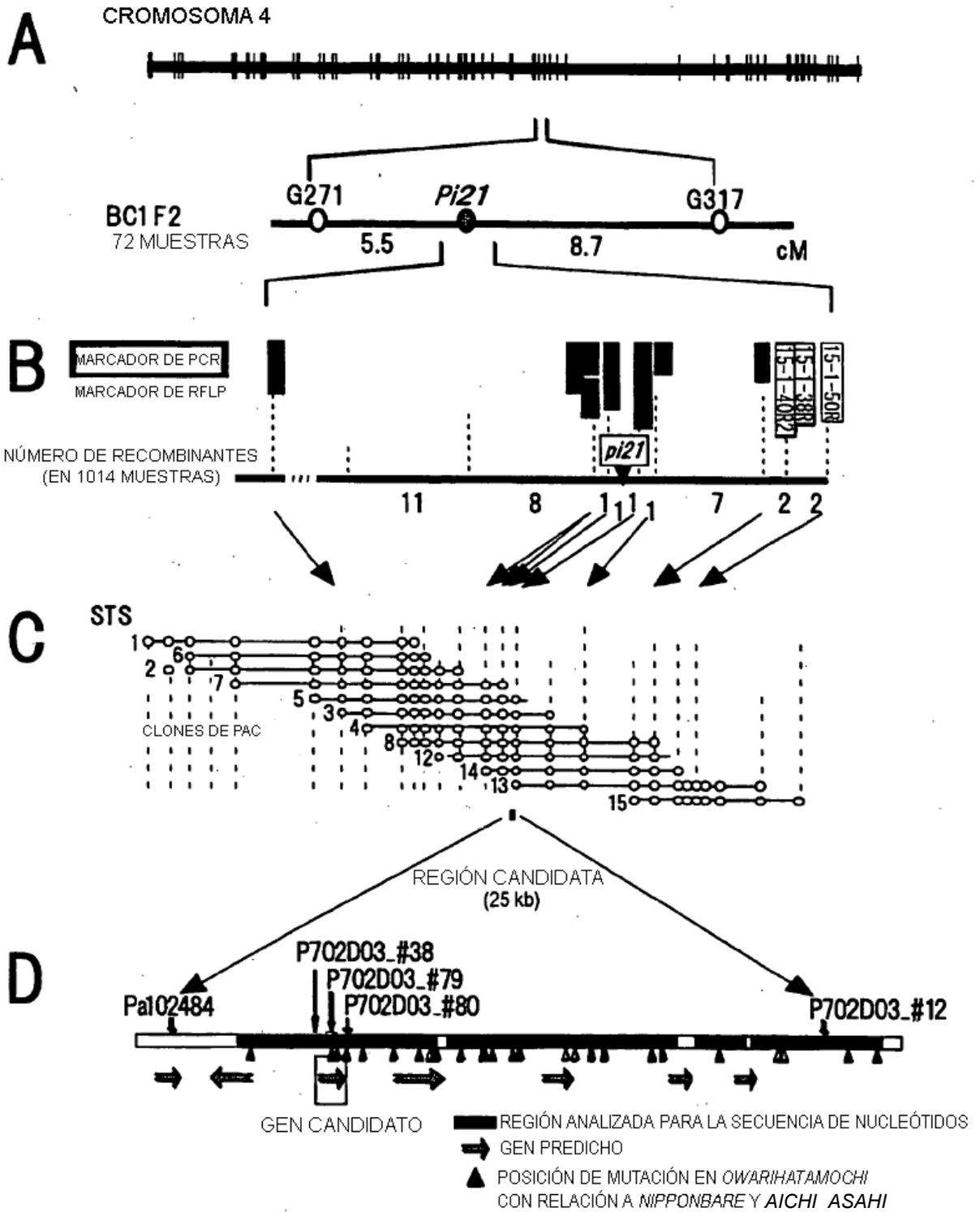


FIG 3

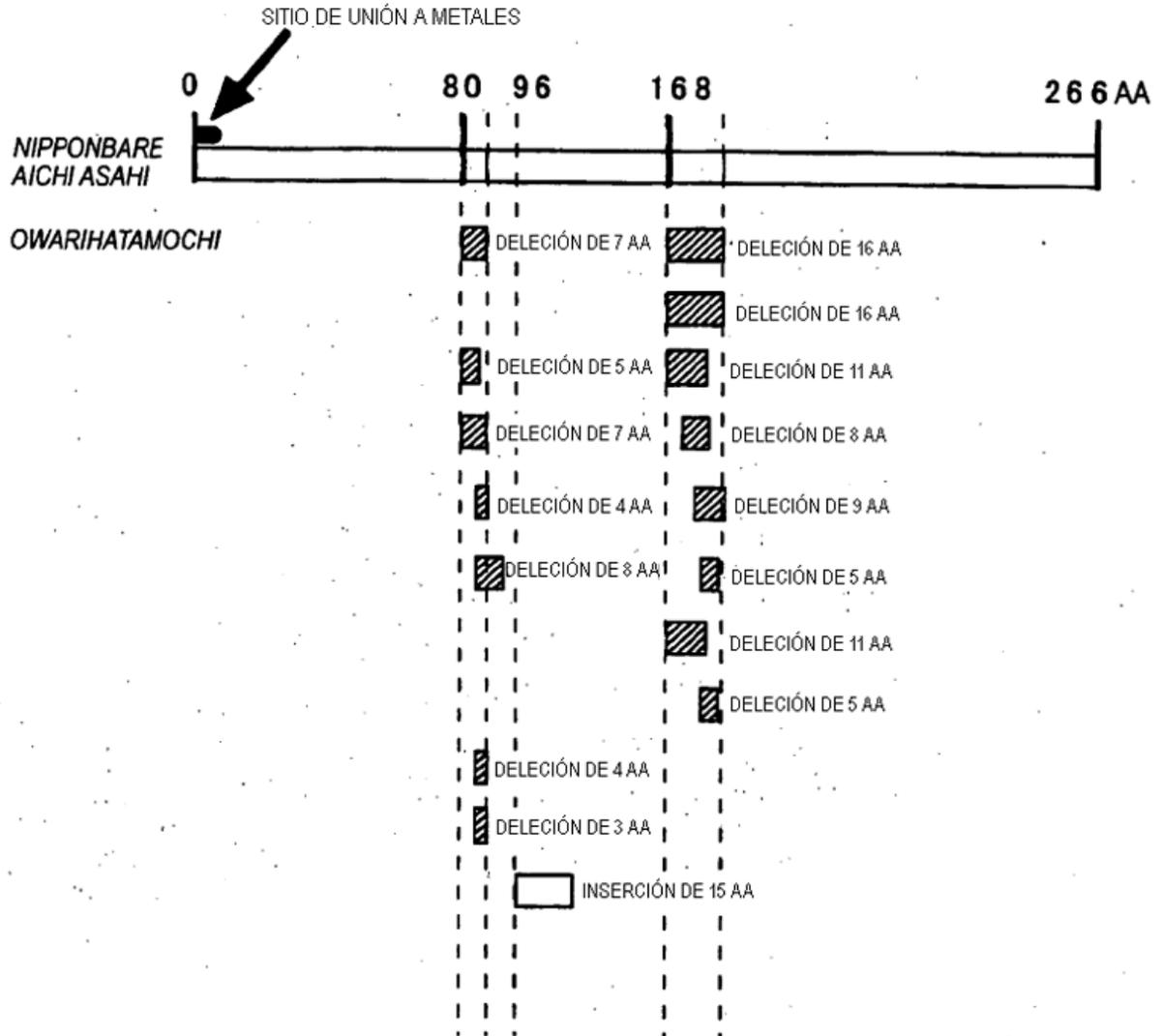
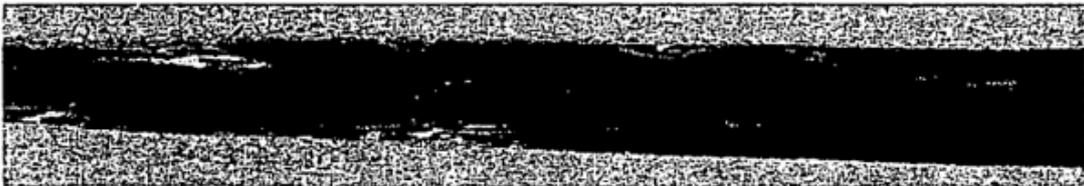


FIG. 4

A. VECTOR SOLO (0)



B. 1 COPIA (1)



C. MÚLTIPLES COPIAS ($3 \leq$)

