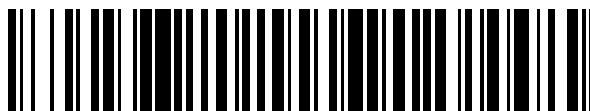


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 551**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2011** **E 11736433 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014** **EP 2585616**

54 Título: **Dispositivo para determinar o estudiar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas o partes de plantas**

30 Prioridad:

24.06.2010 FR 1055042

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.11.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (100.0%)
147 rue de l Université
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BRISSET, MARIE-NOËLLE y
DUGE DE BERNONVILLE, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 522 551 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

Dispositivo para determinar o estudiar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas o partes de plantas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los dispositivos para determinar y/o estudiar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas.

Más precisamente, la presente invención se refiere a un dispositivo que comprende unos medios para determinar el nivel o perfil de expresión de una combinación determinada de genes dianas endógenos en las plantas o partes de plantas, de manera que se identifique la presencia, el nivel y/o la intensidad de la estimulación de las defensas naturales de dichas plantas o partes de plantas.

Técnica anterior

Las plantas están expuestas a múltiples agresiones, abarcando dichas agresiones los eventos que consisten en estrés denominados "abióticos" (sequedad, temperatura extrema, radiación ultravioleta, etc.) y estrés denominados "bióticos" (virus, bacterias, hongos, plagas, etc.).

Es conocido que las plantas poseen una pluralidad de mecanismos endógenos que son capaces de ofrecer una defensa eficaz contra un amplio panel de estrés de este tipo.

En el caso de estrés bióticos, se pueden desarrollar tres niveles de mecanismos de defensa de manera espacio-temporal a partir del punto de infección o de infestación, y contribuir a frenar la propagación de la enfermedad.

En el sitio de penetración del patógeno, las células en contacto con el agente patógeno pueden autodestruirse y retrasar así su desarrollo; este primer fenómeno de defensa se conoce con la denominación de reacción de hipersensibilidad (HR).

A partir del sitio de infección, se pueden transmitir unas señales de alerta a las células vecinas, lo que crea una zona local de resistencia adquirida, en la que se acumulan numerosos compuestos de defensa; este segundo nivel de defensa asegura una resistencia adquirida local (LAR).

Las señales también se pueden transmitir a la planta entera, lo que induce un tercer nivel de defensa: la resistencia adquirida sistémica (SAR).

Unos fenómenos o vías fisiológicas bien caracterizados de los mecanismos de defensa inducibles por los agentes patógenos, implicados en los niveles de defensa LAR y SAR son, por ejemplo:

- (i) la producción de compuestos anti-microbianos, tales como las proteínas relativas a los patógenos (habitualmente denominadas "proteínas PR" o "PRP") y las fitoalexinas,
- (ii) el refuerzo de las paredes celulares (depósito de calosa, lignificación, reticulación de proteínas), y
- (iii) la producción de ciertas hormonas de plantas, en particular el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET), desempeñando dichas hormonas un papel importante en la señalización de los mecanismos de defensa inducidos por los estrés.

Además de estas reacciones de defensa inducidas por el estrés, la inducción de la SAR confiere, a la planta, la capacidad de resistir a ataques ulteriores, incluso en localizaciones lejanas con respecto al primer sitio de infección o de infestación en dicha planta.

Puede ocurrir que los mecanismos de defensas no estén activados de manera completa, sino que los tejidos solamente estén "sensibilizados". Una expresión más rápida y reforzada de los mecanismos de defensa se activa sólo después de la exposición de la planta a un estrés ulterior. Este fenómeno se denomina habitualmente "priming" o "potencialización".

Este conocimiento profundo de los mecanismos de defensa de las plantas ha permitido el desarrollo y la utilización de productos fitosanitarios, que no actúan ya directamente sobre la causa del estrés, sino que presentan la propiedad de actuar indirectamente por la activación y la estimulación de los mecanismos de defensa natural.

Unos productos de este tipo con un efecto estimulador de las defensas naturales (también denominados "estimuladores de las defensas naturales" o bajo el acrónimo "SDN") pueden ser clasificados según dos familias principales:

(i) los compuestos denominados "estimuladores directos" que conllevan, una vez aplicados sobre la planta, una activación completa de las reacciones de defensa, haya presencia o no de patógenos, y

5 (ii) los compuestos denominados "potencializadores" que activan, después de la aplicación sobre la planta, únicamente el fenómeno de "potencialización" antes citado (activándose las reacciones de defensa sólo tras un ataque por un agente patógeno o un estrés).

10 La mayoría de estos productos SDN son también conocidos bajo la denominación de "elicitores" (o "elictor") o también de "inductores de resistencia".

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre estos mecanismos de defensa, y los productos con efecto estimulador de las defensas naturales, a partir de especies modelos, en particular a partir de *Arabidopsis thaliana*.

15 Se precisa no obstante que en la actualidad no existe ningún marco reglamentario específico que rijas las condiciones de comercialización y de utilización de los productos SDN.

20 Así, para beneficiarse de una autorización de comercialización (AMM), dichos productos SDN pueden entrar (i) tal cual, en la categoría de los insumos fitofarmacéuticos, o (ii) en mezcla con moléculas fertilizantes, en la categoría de los insumos fertilizantes.

Hasta la fecha, se han emitido muy pocas AMM para insumos fitofarmacéuticos para productos SDN.

25 En lo que se refiere más específicamente al conocimiento de los efectos de estos insumos sobre las plantas, la estimulación de las defensas naturales se estudia generalmente sólo a una escala celular, por ejemplo sobre suspensiones celulares o sobre órganos independientes.

30 Según le consta a la solicitante, generalmente no está demostrado un efecto de estimulación de las defensas naturales a nivel molecular sobre las plantas enteras.

Por el contrario, se conoce una gran diversidad de productos homologados como insumos fitofarmacéuticos o como insumos fertilizantes, que serían susceptibles de ejercer también una acción de estimulación de las defensas naturales de plantas, aunque dicha actividad adicional no se haya demostrado o identificado.

35 Algunos productos también podrían tener un efecto inhibidor de las defensas naturales de las plantas.

La situación expuesta anteriormente para las plantas en general, se encuentra en particular para las plantas de la familia de las *Rosaceae*, que incluye diversas especies frutales.

40 Existe por lo tanto la necesidad de la puesta a disposición de los profesionales de un dispositivo o herramienta polivalente que permita identificar, de manera simple y rápida, el estado de la estimulación de las defensas naturales de plantas o de partes de plantas, en particular de la familia de las *Rosaceae*.

45 Este dispositivo o herramienta polivalente tendría también ventajosamente como objetivo permitir el cribado de las sustancias por sus propiedades de estimulación de las defensas naturales de las plantas, incluyendo de plantas que pertenecen a la familia de las *Rosaceae*.

50 Un dispositivo o herramienta de este tipo debería ofrecer en particular la posibilidad de realizar una discriminación entre (i) los productos SDN que activan efectivamente las defensas de las plantas, y (ii) los productos que están desprovistos de dicho efecto.

55 Este dispositivo o herramienta permitiría así realizar el cribado de nuevos productos SDN y efectuar unos estudios diversos sobre los SDN, por ejemplo estudios que pretenden determinar el o los mecanismos de acción y/o la o las vías moleculares implicadas en el efecto de estimulación de las defensas de una planta por un producto SDN particular, mediante una combinación particular de productos SDN, o también por una combinación entre uno o varios productos SDN con uno o varios insumos susceptibles de presentar una acción antagonista sobre la estimulación de las defensas.

60 El documento WO 2009/041805 A1 (2 de abril de 2009) describe la identificación de genes de factores de transcripción cuya expresión es inducida o reprimida en raíces de *Arabidopsis* durante la estimulación de las defensas naturales (priming) en presencia o bien de una bacteria WCS417r, o bien de ácido beta-aminobutírico (BABA), así como la utilización de un juego seleccionado de 37 factores de transcripción como marcadores de la estimulación de las defensas naturales.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo para determinar o estudiar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas o partes de plantas, dispositivo que comprende unos medios de determinación del nivel de expresión en ARNm expresado por una combinación de genes diana en una muestra de plantas o partes de plantas, comprendiendo dichos medios de determinación:

- (a) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15;
- (b) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: PAL, CHS, DFR, ANS, PPO;
- (c) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: HMGR, FPPS, Far;
- (d) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm del gen diana CSL;
- (e) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes siguientes: APOX, GST, POX;
- (f) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: CalS, Pect, CAD;
- (g) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: EDS1, WRKY;
- (h) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: LOX2, JAR;
- (i) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: ACCO, EIN3.

En algunos modos de realización, dicho dispositivo comprende los medios de determinación del nivel de expresión en ARNm de la combinación de los genes diana siguientes: PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15, PAL, CHS, DFR, ANS, PPO, HMGR, FPPS, Far, CSL, APOX, GST, POX, CalS, Pect, CAD, EDS1, WRKY, LOX2, JAR, ACCO, EIN3.

En algunos modos de realización, dichos medios de determinación del nivel de expresión en ARNm de un gen diana se seleccionan de entre los fragmentos de ácido nucleico capaces de hibridarse de manera específica a los ARNm expresados por dicho gen diana o a los ADNc correspondientes, o a fragmentos de dichos ARNm o dichos ADNc.

En algunos modos de realización, los fragmentos de ácido nucleico capaces de hibridarse de manera específica a los ARNm expresados por dicho gen diana o a los ADNc correspondientes consisten en unos cebadores, siendo dichos cebadores seleccionados preferentemente de entre las secuencias siguientes SEC ID nº 32 a 87.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para identificar un perfil de expresión en ARNm de una combinación de genes diana que permite determinar, o por lo menos evaluar, un estado de estimulación de las defensas naturales de plantas o de partes de plantas, procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- (i) determinar el perfil de expresión en ARNm de una combinación de genes diana por medio del dispositivo antes citado, en un conjunto de plantas o de partes de plantas, cuyo estado de estimulación de sus defensas naturales es conocido, y después
- (ii) determinar un perfil de expresión en ARNm de dicha combinación de genes diana que corresponde a un estado determinado de estimulación de las defensas naturales de dichas plantas o partes de plantas, partiendo de los datos procedentes de la etapa (i).

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales de una planta o de una parte de planta, que comprende las etapas siguientes:

- (i) extraer una muestra a partir de dicha planta o de dicha parte de planta,
- (ii) determinar el perfil de expresión en ARNm de una combinación de genes diana en dicha muestra extraída en la etapa (i), por medio del dispositivo antes citado,

(iii) comparar el perfil de expresión en ARNm obtenido en la etapa (ii) con un perfil de expresión de referencia,

(iv) determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales de dicha planta o de dicha parte de planta, a partir de dicho perfil de expresión en ARNm obtenido durante la etapa (ii).

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para seleccionar una sustancia que tiene la propiedad de modular el estado de estimulación de las defensas naturales de una planta o de una parte de planta, que comprende las etapas siguientes:

(i) poner en contacto dicha planta o dicha parte de planta con la sustancia a ensayar,

(ii) determinar el perfil de expresión en ARNm de una combinación de genes diana en una muestra extraída a partir de dicha planta o de dicha parte de planta tras la etapa (i), mediante el dispositivo antes citado,

(iii) comparar el perfil de expresión en ARNm obtenido en la etapa (ii) con un perfil de expresión en ARNm de referencia, para determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales en dicha muestra,

(iv) seleccionar positivamente dicha sustancia si la comparación en la etapa (iii) muestra que dicha sustancia ensayada en la etapa (i) modula el estado de estimulación de las defensas naturales de dicha planta o de dicha parte de planta.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para seleccionar una planta que presenta un estado de estimulación de las defensas naturales susceptible de conferirles una resistencia mejorada a por lo menos un estrés biótico y/o abiótico de interés, que comprende las etapas siguientes:

(i) aplicar dicho o dichos estrés a una planta o a una parte de planta,

(ii) determinar el perfil de expresión en ARNm de una combinación de genes diana en una muestra extraída a partir de la planta o de dicha parte de planta, por medio del dispositivo antes citado,

(iii) comparar el perfil de expresión en ARNm obtenido en la etapa (ii) con un perfil de expresión de referencia, para determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales en dicha muestra,

(iv) seleccionar positivamente dicha planta o dicha parte de planta si la comparación de la etapa (iii) muestra que dicha planta o dicha parte de planta posee un estado de estimulación de las defensas naturales susceptible de conferirles una resistencia mejorada a por lo menos un estrés biótico y/o abiótico de interés.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han identificado un conjunto específico de genes diana, cuyo nivel o perfil de expresión constituye un medio simple y eficaz para determinar y/o estudiar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas, ventajosamente de las plantas de la familia de las *Rosaceae*.

En efecto, los inventores han puesto en evidencia que el análisis de la expresión de una combinación específica de genes diana permite determinar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas que son (i) expuestas a un producto SDN, (ii) expuestas a una fuente o a un evento de estrés biótico, (iii) expuestas a una fuente o a un evento de estrés abiótico, o bien (iv) a una combinación de dos o tres de las exposiciones antes citadas.

Estos resultados han permitido que los inventores desarrollen un dispositivo, ventajosamente un dispositivo que comprende unos medios para la determinación, ventajosamente *in vitro*, del nivel o perfil de expresión de una combinación determinada de genes diana (ventajosamente por análisis transcriptómico dirigido o por análisis proteómico dirigido), en una muestra que procede de una planta, incluyendo una muestra que procede de una parte de planta, incluyendo de una planta de la familia de las *Rosaceae*.

Los inventores han demostrado que la determinación *in vitro* del nivel o perfil de expresión de esta combinación determinada de genes diana permite el estudio y/o la determinación del estado de estimulación de las defensas naturales de la planta de la que procede dicha muestra.

La presente invención tiene así por objeto un nuevo dispositivo o una nueva herramienta de búsqueda, ventajosamente un dispositivo de biología molecular, para la caracterización de una muestra biológica, por determinación del nivel de expresión de una combinación específica de genes diana.

Más precisamente, la presente invención se refiere a un dispositivo para determinar y/o estudiar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas, dispositivo que comprende unos medios para determinar el nivel o perfil de expresión de una combinación de genes diana en una muestra de planta o de parte de planta,

comprendiendo dichos medios de determinación:

- (a) un medio de determinación del nivel de expresión de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15;
- (b) un medio de determinación del nivel de expresión de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: PAL, CHS, DFR, ANS, PPO;
- (c) un medio de determinación del nivel de expresión de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: HMGR, FPPS, Far;
- (d) un medio de determinación del nivel de expresión del gen diana CSL;
- (e) un medio de determinación del nivel de expresión de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes siguientes: APOX, GST, POX;
- (f) un medio de determinación del nivel de expresión de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: CalS, Pect, CAD;
- (g) un medio de determinación del nivel de expresión de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: EDS1, WRKY;
- (h) un medio de determinación del nivel de expresión de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: LOX2, JAR;
- (i) un medio de determinación del nivel de expresión de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: ACCO, EIN3.

A pesar del número limitado y determinado de genes diana analizados, los inventores han demostrado que el dispositivo según la invención constituye una herramienta particularmente polivalente y potente, que permite el estudio y/o la determinación del estado de estimulación de las defensas naturales de las plantas (i) expuestas a uno o varios compuestos o a una o varias composiciones estimuladores de defensas naturales y/o (ii) expuestas a una gran variedad de estrés, lo que abarca tanto unos estrés bióticos como unos estrés abióticos, y/o (iii) expuestas a una combinación de las exposiciones antes citadas (i) y (ii).

El dispositivo según la invención presenta el interés de aportar unos resultados simples, rápidos y eficazmente interpretables, sobre el estado de estimulación de las defensas naturales de una planta.

El dispositivo según la invención permite en particular estudiar y/o identificar unos compuestos candidatos, susceptibles de consistir en unos estimuladores de las defensas naturales de las plantas y capaz de inducir un mecanismo de reacción de las plantas frente a una agresión por organismos dañinos y/o un mecanismo de reacción de defensa frente a estrés abióticos naturales.

Según un modo de realización preferido, el dispositivo según la invención comprende los medios de determinación del nivel de expresión de los genes siguientes:

- (i) para el grupo (a), un medio de determinación del nivel de expresión de uno por lo menos de los genes siguientes: PR-1, PR-2, PR-4 o PR-8, un medio de determinación del nivel de expresión del gen PR-5, un medio de determinación del nivel de expresión del gen PR-14 y un medio de determinación del nivel de expresión del gen PR-15, y/o
- (ii) para el grupo (b), un medio de determinación del nivel de expresión del gen PAL, un medio de determinación del nivel de expresión de uno por lo menos de los genes siguientes: CHS, DFR o ANS, y un medio de determinación del nivel de expresión del gen PPO, y/o
- (iii) para el grupo (c), un medio de determinación del nivel de expresión de por lo menos uno de los genes siguientes: HMGR y Far, y un medio de determinación del nivel de expresión del gen FPPS, y/o
- (iv) para el grupo (e), un medio de determinación del nivel de expresión del gen APOX y un medio de determinación del nivel de expresión de por lo menos uno de los genes siguientes: GST y POX.

Según un modo de realización más preferido, este dispositivo comprende los medios de determinación del nivel de expresión de la combinación de los genes diana siguientes: PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15, PAL, CHS, DFR, ANS, PPO, HMGR, FPPS, Far, CSL, APOX, GST, POX, CalS, Pect, CAD, EDS1, WRKY, LOX2, JAR, ACCO, EIN3.

Los medios de determinación del nivel de expresión de un gen diana se seleccionan ventajosamente de entre los fragmentos de ácido nucleico capaces de hibridarse de manera específica a los ARNm expresados por dicho gen diana o a los ADNc correspondientes, o a unos fragmentos de dichos ARNm o dichos ADNc.

5 En los modos de realización anteriores, los fragmentos de ácido nucleico antes citados consisten ventajosamente en cebadores nucleotídicos que se hibridan específicamente con los ARNm, los ADNc o unos fragmentos de éstos, derivados de cada uno de los genes diana de interés.

10 En algunos modos de realización, los cebadores nucleotídicos correspondientes están ventajosamente adaptados a la determinación del nivel de expresión de los genes diana mediante un método de PCR cuantitativa.

Los cebadores nucleotídicos se seleccionan ventajosamente de entre las secuencias siguientes SEC ID nº 32 a 87. La utilización de estos cebadores, en la disposición según la invención, se ilustra en los ejemplos.

15 Según un modo particular de realización, los fragmentos de ácido nucleico o dichos anticuerpos son inmovilizados sobre un soporte.

20 En los modos de realización del dispositivo en los que los medios de determinación del nivel de expresión de un gen diana consisten en unos ácidos nucleicos, dicho dispositivo consiste así ventajosamente en un chip de ADN, que puede ser designado también bajo la denominación de "chip de baja densidad cuantitativa" o "qPFD" (debido al número limitado de genes diana).

25 La presente invención se refiere asimismo a unos procedimientos que utilizan el dispositivo según la invención y que se presentarán en detalle en la descripción, a saber:

- un procedimiento para identificar un perfil de expresión de una combinación de genes diana (también designado "firma" o "firma de expresión") que permite determinar, o por lo menos evaluar, un estado de estimulación de las defensas naturales de plantas;
- un procedimiento para determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas o de una parte de tales plantas;
- un procedimiento para seleccionar una sustancia que tiene la propiedad de modular el estado de estimulación de las defensas naturales de una planta de semillero o de una parte de planta de semillero;
- un procedimiento para seleccionar una planta o una parte de planta, que presenta un estado de estimulación de las defensas naturales susceptible de conferirles una resistencia mejorada a por lo menos un estrés biótico y/o abiótico de interés.

40 Cada uno de estos dispositivos está muy particularmente adaptado para una utilización sobre plantas o partes de plantas que pertenecen a la familia de las *Rosaceae*.

45 Tal como se da a conocer a continuación, la presente invención proporciona por lo tanto un nuevo dispositivo o herramienta para determinar y/o estudiar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas, que utiliza para ello la determinación del perfil de expresión y/o la detección del perfil de expresión y/o la cuantificación del nivel de expresión de una combinación de genes diana en una muestra de planta o de parte de planta.

50 Los inventores han identificado así un conjunto de genes diana contenidos en el genoma de la planta que constituyen unos marcadores biológicos aptos para servir de indicadores en el estudio y/o la determinación de la presencia y/o del nivel y/o de la intensidad del estado de estimulación de las defensas naturales de una planta o de una parte de planta.

55 Los inventores han demostrado que el dispositivo según la invención permite, con un número limitado y determinado de marcadores, determinar y/o estudiar el efecto de un compuesto o de una composición de interés y/o de un estrés biótico y/o de un estrés abiótico, sobre el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas o partes de plantas tratadas.

60 Parece que este dispositivo según la invención es particularmente interesante para el estudio de las plantas o de partes de plantas del género *Rosaceae* o Rosáceas, como se ilustra en los ejemplos.

Después de definir ciertos términos, la presente invención da a conocer los genes diana específicamente seleccionados para el estudio y/o la determinación del estado de estimulación de las defensas naturales de las plantas o partes de plantas, y después describe el dispositivo según la invención con los medios para medir y/o determinar el nivel o perfil de expresión de dichos genes diana respectivos.

65 Un dispositivo de este tipo presenta numerosas aplicaciones que se desarrollarán también a continuación, en

particular (i) la selección y el estudio de compuestos o de composiciones que son aptos para modificar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas o de partes de plantas y/o (ii) la selección de plantas o de partes de plantas que presentan o que son aptas para presentar un estado particular de estimulación de las defensas naturales, por ejemplo tras la aplicación de un compuesto o de una composición de interés y/o de un estrés biótico y/o de un estrés abiótico.

Definición

Por "planta" se entiende cualquier organismo pluricelular que pertenece al sub-reino de las *Tracheobionta*, que comprende los pteridófitos y los espermatofitos. Por "espermatofitos" se entiende un organismo que pertenece a los gimnospermas o preferentemente a los angiospermas. Entre los angiospermas, se entienden las monocotiledóneas o también las dicotiledóneas y preferentemente los eudicotiledóneas. Por "dicotiledóneas" se entienden las sub-clases siguientes: *Asteridae*, *Caryophyllidae*, *Dilleniidae*, *Hamamelidae*, *Hamamelididae*, *Magnoliidae* o *Rosidae*. Por "*Rosidea*", se entienden las especies: *Apiales*, *Celastrales*, *Cornales*, *Euphorbiales*, *Fabales*, *Geraniales*, *Haloragales*, *Linales*, *Myrtales*, *Podostemales*, *Polygalales*, *Proteales*, *Rafflesiales*, *Rhamnales*, *Rhizophorales*, *Rosales*, *Santatales*, *Sapindales*. En las especies de las *Rosidea*, se seleccionará preferentemente una planta de la familia de las *Rosaceae*, incluyendo los manzanos.

Por "muestra" se entiende una muestra biológica que contiene el material biológico que permite detectar la expresión de la combinación de genes diana.

El material biológico puede comprender en particular unas proteínas y/o unos ácidos nucleicos tales como, en particular, los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o los ácidos ribonucleicos (ARN). Este material biológico comprende el material específico de los genes diana, tal como en particular los ARNm transcritos por los genes diana o las proteínas procedentes de estos ARNm, pero puede también comprender un material no específico de los genes diana, tales como en particular los ARNm transcritos por los genes diferentes de los genes diana o las proteínas procedentes de estos ARNm. Según un modo de realización de la invención, el material biológico comprende unos ARN, y aún más preferentemente unos ARN totales; los ARN totales comprenden los ARN de transferencia, los ARN mensajeros (ARNm), tales como los ARNm transcritos por los genes diana pero también transcritos por cualquier otro gen, y los ARN ribosomales.

Las muestras biológicas abarcan unos fragmentos de tejidos extraídos de la planta, así como los productos resultantes de la extracción o la purificación de los ácidos nucleicos (ADN, ARNm) o de las proteínas contenidas en dichos fragmentos de tejidos, así como algunos productos de transformación de las sustancias contenidas en dichos fragmentos de tejido o en dichos productos de transformación, por ejemplo los ácidos nucleicos de tipo ADNc obtenidos por transcripción inversa de los ácidos nucleicos de tipo ARNm.

Por "parte de planta" se entiende el fragmento de una planta que contiene por lo menos una célula de planta, por ejemplo un órgano de la planta (tal como una hoja, una yema, una flor, una raíz, un fruto, una semilla o parte de éstos) o un tejido de la planta (tal como un meristemo).

Por "estrés medioambientales" se designa el conjunto de los factores exteriores a una planta susceptible de afectar al metabolismo normal de esta planta e inducir en ella una reacción de adaptación y/o de defensa. Los estrés medioambientales pueden proceder de seres vivos (se trata de estrés biótico), o de otros factores (se habla entonces de estrés abiótico).

Los estrés bióticos agrupan en particular el conjunto de los agentes patógenos microbianos, tales como los agentes patógenos fúngicos, bacterianos, virales o de plagas, y las infecciones o infestaciones de las cuales son responsables.

Los estrés abióticos agrupan el conjunto de los estrés de naturaleza física o química, y en particular los estrés oxidativos o climáticos; se trata en particular de estrés hídricos, como la falta de agua, o estrés térmicos como el frío o el calor. Los estrés oxidativos agrupan el conjunto de los estrés que llevan al aumento de la concentración de agentes oxidantes en una planta o una parte de planta.

Por "estado de estimulación de defensas naturales" se entiende el desarrollo de un conjunto de modificaciones biológicas que confieren a esta planta (i) una resistencia inmediata, en particular LAR o SAR, y/o (ii) una pre-sensibilización de tipo potencialización gracias a la cual se vuelve capaz de reaccionar más eficazmente a un estrés ulterior, biótico o abiótico.

El "estado de estimulación de defensas naturales" se refiere también al estatus, actividad o no actividad, de las diferentes vías moleculares implicadas en los mecanismos de defensas naturales.

Por "estado de estimulación de defensas naturales" se entiende también la resistencia al estrés, es decir diferentes niveles de tolerancia al estrés, a saber una facultad de las plantas para hacer frente a los estrés bióticos y/o estrés abióticos. La resistencia al estrés puede ser clasificada según diferentes niveles: - sensibilidad, - tolerancia media a

una o varias agresiones bióticas o abióticas, y - tolerancia elevada o resistencia total a una o varias agresiones bióticas o abióticas.

Por "estado de estimulación de defensas naturales" se entiende en particular la capacidad de una planta para resistir a las enfermedades, es decir diferentes niveles de resistencia y/o de tolerancia de una planta a las enfermedades, incluyendo la sensibilidad, la resistencia media y la resistencia elevada o una resistencia total a uno o varios agentes patógenos. Puede corresponder a una modificación de los síntomas inducidos por unos agentes patógenos de la enfermedad (tales como la frecuencia y/o el tamaño de las lesiones, etc.), así como la extensión de la colonización de los tejidos por el agente patógeno o el porcentaje de infección, con respecto a los observados en las plantas control sensibles y cultivadas con unas enfermedades idénticas. La resistencia a la enfermedad puede también ser ilustrada por un crecimiento más elevado y/o un rendimiento de las plantas resistentes en comparación con las plantas sensibles cuando se cultivan bajo la presión de la enfermedad.

Las expresiones "estado de estimulación de las defensas naturales activado", "estado de estimulación de las defensas naturales inducido", "mejora de la resistencia al estrés", "resistencia incrementada a la enfermedad" y "reacción de defensa reforzada" se refieren en particular a cualquier aumento significativo de la resistencia al estrés o de la resistencia a las enfermedades de una planta o de tejidos vegetales, con respecto a un control apropiado tal como una planta no sometida a un producto SDN o a este mismo estrés o a esta misma enfermedad.

Por "estado de estimulación de las defensas naturales activado", "estado de estimulación de las defensas naturales inducido", se refiere también a cualquier activación/inducción de las vías moleculares implicadas en los mecanismos de defensas naturales en una planta o parte de planta sometida a un producto SDN o a un estrés, con respecto a un control apropiado tal como una planta no sometida a este mismo producto SDN o a este mismo estrés.

Por ejemplo, por "estado de estimulación de defensas naturales" se entiende en particular un estado "resistente" o "sensible" a *E. amylovora* responsable del fuego bacteriano.

Por "determinación y/o estudio del estado de estimulación de las defensas naturales" se entiende tanto (i) la determinación y/o el estudio de la existencia o de la ausencia de dicha estimulación de las defensas naturales, como (ii) la determinación y/o el estudio del nivel y/o de la intensidad de esta estimulación de las defensas naturales.

Por "nivel de expresión de una combinación de genes diana" o "perfil de expresión de una combinación de genes diana" se entiende cualquier parámetro o marcador biológico detectable, medible y/o cuantificable, en la planta o parte de la planta estudiada, que corresponde, directa o indirectamente, al nivel de expresión de cada uno de los genes seleccionados.

Los términos "nivel de expresión" incluyen la ausencia y/o la presencia y/o un valor representativo de la cantidad de ARN mensajeros ("ARNm" o "mRNA") transcritos a partir del ADN genómico que corresponde a los genes diana seleccionados.

Por "sobreexpresión" o "activación" de un gen, se entiende un nivel cuantitativo de expresión del marcador de dicho gen que está multiplicado por lo menos por 3 con respecto a un nivel cuantitativo de la referencia, más preferentemente 4x, 5x, 10x, 20x, 30x o más.

Por "sobreexpresión" o "inactivación" o "represión" de un gen, se entiende un nivel cuantitativo de expresión del marcador de dicho gen que está dividido por lo menos por 3 con respecto a un nivel cuantitativo de la referencia, preferentemente por lo menos 4x, 5x, 10x, 20x, 30x o más, incluso no detectable.

Un nivel de expresión "constante" de un gen corresponde a un nivel cuantitativo de expresión del marcador de dicho gen que está comprendido en un campo delimitado por una división por 3 y una multiplicación por 3 de dicho nivel cuantitativo, con respecto al nivel cuantitativo de la referencia.

El nivel de expresión de los marcadores puede ser "relativo", es decir que la variación de nivel de expresión de uno o varios genes se compara con respecto al nivel de expresión de otras muestras, después de la "normalización" de los niveles de expresión utilizando por ejemplo unos genes control.

El múltiplo de modulación de expresión de cada uno de los genes diana, en sobreexpresión o en sub-expresión, se puede medir utilizando por ejemplo unos medios de determinación de tipo PCR cuantitativa, ventajosamente en tiempo real, como se ilustra mediante los ejemplos.

Los resultados se pueden obtener según el método de $\Delta\Delta Ct$ (Delta Delta CT) que proporciona las expresiones relativas de los genes de defensa en una muestra dada con respecto a la muestra denominada "calibrador" (por ejemplo una muestra de una planta o parte de planta no tratada, o también por ejemplo una muestra de una planta o parte de planta tratada), expresiones normalizadas por la media geométrica de los genes de referencia de estas muestras (Vandesompele *et al.*, Genome Biol. 3(7): research0034.1-0034.11, 2002; Livak y Schmittgen, Methods 25:402-408, 2001).

El nivel de expresión de los marcadores puede también ser "absoluto" es decir que los niveles de expresión de los marcadores se refieren a la cantidad absoluta de dichos marcadores (ARNm) en una muestra.

- 5 Según la invención, un "perfil de expresión" o una "firma de expresión" consiste en una representación del conjunto de los valores de niveles de expresión de cada uno de los genes diana ensayados, para la combinación de genes diana ensayados.

Combinación de genes diana utilizados en el dispositivo según la invención

10 El dispositivo según la invención comprende unos medios para determinar y/o estudiar el nivel de expresión de una combinación establecida de genes diana, o dicho de otra manera "un conjunto de genes diana".

Esta combinación según la invención se compone de nueve grupos de genes diana (a) a (i) siguientes:

- 15 (a) por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes que codifican unas PR-proteínas: PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15;
- 20 (b) por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes que codifican unas enzimas de la vía de los fenilpropanoides: PAL, CHS, DFR, ANS, PPO;
- (c) por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes que codifican unas enzimas de la vía de los isoprenoides: HMGR, FPPS, Far;
- 25 (d) un gen diana CSL, que codifica para una enzima del catabolismo de la cisteína;
- (e) por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes que codifican para unas enzimas antioxidantes: APOX, GST, POX;
- 30 (f) por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes que codifican unas enzimas implicadas en las modificaciones de pared: CalS, Pect, CAD;
- (g) por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes implicados en la vía de señalización del ácido salicílico: EDS1, WRKY;
- 35 (h) por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes implicados en la vía de señalización del ácido jasmónico: LOX2, JAR,
- 40 (i) por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana implicados en la vía de señalización el etileno: ACCO, EIN3.

En la práctica, la sobreexpresión en una muestra ensayada de por lo menos uno de los genes diana, y más preferentemente de una combinación de dichos genes diana en por lo menos dos de dichos grupos (a) a (i), con respecto a una muestra no tratada, permite identificar las plantas o partes de plantas que presentan un estado de estimulación de las defensas naturales activado o inducido.

Estos genes diana seleccionados se presentan más en detalle en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1: lista de los genes diana según la invención

50

SEC ID nº	Nombre del gen	Unigen manzano (NCBI)	Función del gen	Nº de registro del manzano ADNc (NCBI)
1	PR-1	Modelo 3966	Proteína 1 relacionada con la patogénesis Proteína PR	AF507974
2	PR-2	Modelo 2984	Proteína 2 relacionada con la patogénesis (glucanasas) Proteína PR	AF494404
3	PR-4	Modelo 2382	Proteína 4 relacionada con la patogénesis (de tipo hevein) Proteína PR	CN877594
4	PR-5	Modelo 999	Proteína 5 relacionada con la patogénesis (de tipo taumatina, osmotina)	DR998561

SEC ID nº	Nombre del gen	Unigen manzano (NCBI)	Función del gen	Nº de registro del manzano ADNc (NCBI)
			Proteína PR	
5	PR-8	Modelo 3935	Proteína 8 relacionada con la patogénesis (quitinasa de clase III)	DQ318214
			Proteína PR	
6	PR-14	Modelo 12217	Proteína 14 relacionada con la patogénesis (proteína de transferencia lipídica)	CV656658
			Proteína PR	
7	PR-15	-	Proteína 15 proteína de transferencia lipídica (oxalato oxidasa)	GO500607
			Proteína PR	
8	PAL	Modelo 2983	Fenilalanina amonio-liasa	AF494403
			Vía de los fenilpropanoides	
9	CHS	Modelo 6113	Chalcona sintasa	AF494401
			Vía de los fenilpropanoides	
10	DFR	Modelo 13736	Dihidroflavonol reductasa	AF494390
			Vía de los fenilpropanoides	
11	ANS	Modelo 2932	Antocianidina sintasa	DQ156905
			Vía de los fenilpropanoides	
12	PPO	Modelo 2905	Polifenol oxidasa	L29450
			Vía de los fenilpropanoides	
13	HMGR	Modelo 2960	Hidroximetil glutarato-CoA reductasa	AY043490
			Vía de los isoprenoides	
14	FPPS	Modelo 2964	Farnesil pirofosfato sintasa	AY083165
			Vía de los isoprenoides	
15	Far	Modelo 3011	(E,E)-alfa-farneseno sintasa	EB111255
			Vía de los isoprenoides	
16	CSL	Modelo 12560	C-S-liasa	AY347795
			Catabolismo de la cisteína	
17	APOX	Modelo 1891	Ascorbato peroxidasa	CN928974
			Sistema antioxidante	
18	GST	Modelo 12372	Glutatión S-transferasa	FE969955
			Sistema antioxidante	
19	POX	Modelo 11566	Peroxidasa	CN913385
			Sistema antioxidante	
20	CalS	Modelo 12945	Calosa sintasa	CN496203
			Modificación parietal	
21	Pect	Modelo 15511	Pectina-metilesterasa	CV628630
			Modificación parietal	
22	CAD	Modelo 2625	Cinamil alcohol deshidrogenasa	AF053084
			Modificación parietal	
23	EDS1	Modelo 1759	Proteína de de resistencia a la enfermedad EDS1	CN949066
			Señalización del ácido salicílico	
24	WRKY	-	factor 30 de transcripción WRKY	AY347836
			Señalización del ácido salicílico	
25	LOX2	Modelo 10456	Lipoxigenasa AtLOX2	CN941066
			Señalización del ácido jasmónico	
26	JAR	Modelo 2326	Resistente al jasmonato 1	CN879199
			Señalización del ácido jasmónico	
27	ACCO	Modelo 3241	1-aminociclopropeno-1-carboxilato oxidasa	AB086888
			Señalización del etileno	

SEC ID nº	Nombre del gen	Unigen manzano (NCBI)	Función del gen	Nº de registro del manzano ADNc (NCBI)
28	EIN3	Modelo 12601	PROTEÍNA 1 DE TIPO F-BOX EIN3	CV082047
			Señalización del etileno	
29	TuA	Modelo 3499	Tubulin alpha-1 chain	CO065788
			Gen de referencia	
30	Actina	Modelo 701	Actina 7	CV151413
			Gen de referencia	
31	GAPDH	Modelo 1683	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	CN494000
			Gen de referencia	

Entre estos genes, se pueden distinguir unos genes cuya función es conocida pero que nunca se han puesto en relación con los mecanismos de defensas naturales en las Rosáceas, por ejemplo el gen CSL.

- 5 Los genes TuA, Actina y GAPDH constituyen unos genes marcadores cuyo nivel de expresión es independiente del estado de estimulación de las defensas naturales. Estos genes son citados en la presente memoria únicamente a título de ejemplo. Dichos genes "reporteros" permiten corregir el nivel de expresión determinado para cada uno de los genes diana.
- 10 En la presente descripción, las denominaciones empleadas para designar cada uno de los genes diana corresponden a una denominación internacional reconocida, que se encuentran en particular en las bases de datos de secuencias de genes y de secuencias de proteínas, por ejemplo las bases UniGene propuestas por el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA). Para ello, se refiere preferentemente a la base de datos UniGene *Malus domestica*.
- 15 Los genes diana en cuestión son también definidos respectivamente por las secuencias editables a partir de los números de registro Unigene especificados en la tabla 1.
- 20 Los genes diana según la invención designan también las "variantes" o "unigenes" o alelos que corresponden a estas secuencias.
- Las variantes incluyen las secuencias, o genes, homólogas u ortólogas encontradas preferentemente en los géneros o las variedades de Rosáceas diferentes de *Malus domestica*.
- 25 Más generalmente, las variantes incluyen ventajosamente también las secuencias, o genes, homólogas u ortólogas que se encuentran en cualquier otra planta, preferentemente en cualquier organismo perteneciente al sub-reino de las *Tracheobionta*, más preferentemente perteneciente a los espermatofitos, más preferentemente a los angiospermas, más preferentemente a las dicotiledóneas y más preferentemente a *Rosidea*.
- 30 El término "ortólogo" u "homólogo" para una secuencia, un gen o una proteína, se refiere en la presente memoria a la secuencia, al gen o a la proteína, homóloga que se encuentra en otra especie, que presenta la misma función que la secuencia, el gen o la proteína de interés, pero (generalmente) que ha divergido en secuencia en cuanto las especies que comprenden dichos genes han divergido (los genes han evolucionado a partir de un gen ancestral común por especiación). Dichas secuencias o genes ortólogos pueden así ser identificados en otras especies
- 35 vegetales mediante una técnica de comparación de secuencias (por ejemplo basadas en el porcentaje de identidad de secuencias sobre la secuencia entera o sobre dominios específicos) y/o de análisis funcional.
- Dichas secuencias ortólogas se han identificado por ejemplo en otros géneros de la familia de las Rosáceas.
- 40 La tabla 2A siguiente precisa el número de registro en la base de datos GenBank propuesta por el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), de cada una de las secuencias ortólogas identificadas.

Tabla 2A: Secuencias ortólogas para los genes diana según la invención

nº	Nombre del gen	Ortólogo en las <i>Fragaria</i>	Ortólogo en los <i>Prunus</i>	Ortólogo en los <i>Pyrus</i>	Ortólogo en las <i>Rosa</i>
1	PR-1	DV440399	DN556381 GE653251	AF195235	EC586767
2	PR-2	EX682264	DN554095	AJ504892	EC587362
3	PR-4	EX657003	CB823353	-	-
4	PR-5	DY668082 EX674853	GE653177	FK939207	BI977710

n°	Nombre del gen	Ortólogo en las <i>Fragaria</i>	Ortólogo en los <i>Prunus</i>	Ortólogo en los <i>Pyrus</i>	Ortólogo en las <i>Rosa</i>
5	PR-8	DY672350	CV051978 CV052812	AJ504863	BI977412
6	PR-14	DY673738	AM290861	AF195216	EC589716
7	PR-15	DY673400	GR410635	-	EC586210
8	PAL	CO817421 EX684393	CV046544	-	-
9	CHS	AI795154 DY667960	CB820023 FE969272	FK939234	CF349759
10	DFR	DY672493 EX661062	CV046853 CB819555	DB999982	-
11	ANS	CX661854	BU039495	FK939239	BI977949
12	PPO	DY667415 EX674603	CV045870	AJ504916	-
13	HMGR	DY669718 EX659154	AM290185 FC861452	-	BQ106200
14	FPPS	DY669331 EX660570	DY644308	-	BQ104581
15	Far	DY675841	DY646265	-	CF349900
16	CSL	CO817796	AJ533335 BU047350	-	-
17	APOX	CX661243 CX661894	CV045878 GE653243	GR957944	EC586214 BI978785
18	GST	DV438230 DV438954	CB820780	DB999954	EC587514
19	POX	DY676157 DY670759	DW341091 GR410510	DC993457	EC586635
20	CalS	EX687641	DY633833	DC993380	BQ104579
21	Pect	DY666714	BU044880	-	BQ104257
22	CAD	CX662236	EE488909	DV440820	CF349542
23	EDS1	DY673255	DY652698 FC866180	-	CF349463
24	WRKY	EX687984	AJ873733	-	-
25	LOX2	DY674691	BU046906	-	CF349741
26	JAR	DY667416	FC864077	-	-
27	ACCO	CX662198 EX670124	AJ833064	DB999960	EC588379
28	EIN3	DY666956	EE488205	-	-
29	TuA	DY671340 DY674254	BU042671	-	BQ106089 BQ105408
30	Actina	DY668010 EX688327	DY650839 CV044868	-	BQ104395 BI977396
31	GAPDH	DY667270 DY667095	DW357797 DW350728	-	BI978153 BQ104075

De la misma manera, el dispositivo según la invención podría ser utilizado para el estudio de plantas de la familia de las *Vitaceae* (vid), en particular unas especies del género *Vitis*, y en particular *Vitis vinifera*.

- 5 A título indicativo, unas secuencias ortólogas, que corresponden a los genes diana, se han identificado por ejemplo en *Vitis vinifera*.

La tabla 2B siguiente precisa el número de registro en la base de datos GenBank propuesta por el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) o en la base de datos propuesta por el Genoscope (Evry, Francia), de cada una de las secuencias ortólogas identificadas.

10

Tabla 2B

Nombre del gen	Ortólogo en <i>Vitis vinifera</i> (Vid)	
	n° de registro EST (NCBI)	n° de registro gen (genoscope)
PR-1	EE253686.1	GSVIVT01037005001
PR-2	GO652966.1	GSVIVT01033538001
PR-4	FG984977.1	GSVIVT01036279001

Nombre del gen	Ortólogo en <i>Vitis vinifera</i> (Vid)	
	n° de registro EST (NCBI)	n° de registro gen (genoscop e)
PR-5	EC925003.1	GSVIVT01019840001
PR-8	EC965083.1	GIDVvT00013094001
PR-14	DT021081.1	GIDVvT00010281001
PR-15	EC968706.1	GSVIVT01031082001
PAL	CN006882.1	GSVIVT01025703001
ANS	CF209704.1	GSVIVT01019892001
CHS	EV241635.1	GSVIVT01032968001
DFR	EE082741.1	GSVIVT01009743001
PPO	CF215866.1	GIDVVT00029382001
HMGR	EC937417.1	GSVIVT01013435001
FPPS	EC962139.1	GSVIVT01014738001
Far	DT009302.1	GSVIVT01000402001
Alli	FC061753.1	GSVIVT01001413001
APOX	CF211522.1	GSVIVT01015626001
GST	EE099033.1	GSVIVT01027961001
POX	DT007525.1	GSVIVT01009107001
CAD	CF511159.1	GSVIVT01025239001
CalS	EE095949.1	GSVIVT01025362001
Pect	EE076956.1	GSVIVT01011699001
EDS1		GSVIVT01007860001
WRKY		GSVIVT01028718001
LOX2	EE107237.1	GSVIVT01025339001
JAR	EC983478.1	GSVIVT01027057001
ACCO	CF511696.1	GSVIVT01006065001
EIN3	CF214803.1	GSVIVT01015548001

Los genes diana según la invención son también definidos por las secuencias SEC ID n° 1 a 28, que corresponden a sus ADNc respectivos, o por las variantes de dichas secuencias según la definición anterior.

- 5 Las secuencias correspondientes también se pueden consultar en la base de datos GenBank (NCBI), mediante unos números de registro precisados en la tabla 1.

Para la noción de "variante" se puede hacer referencia a las definiciones desarrolladas anteriormente.

- 10 Los genes diana según la invención son también designados por las proteínas que codifican, respectivamente.

Las secuencias peptídicas que corresponden a los genes diana se precisan por ejemplo en la base de datos UniGene *Malus domestica*, y pueden ser obtenidas por medio de los números de registro precisados en la tabla 1.

- 15 Según un modo de realización preferido, el dispositivo según la invención comprende unos medios para determinar y/o estudiar el nivel de expresión de por lo menos dos genes en cada uno de los grupos (a), (b), (c), (e), (f), (g), (h) y (i) antes citados.

Este modo de realización preferido ofrece en particular las ventajas siguientes:

- 20
- si los genes diana de un mismo grupo están co-regulados (es sobre todo el caso de los genes de las vías de señalización, que son frecuentemente activados de manera transitoria), pueden tener una expresión secuencial, y el hecho de seleccionar uno sólo aumenta el riesgo de concluir que hay una ausencia de modulación de esta vía (si las extracciones no se efectúan en el momento correcto para un gen dado);
- 25
- si los genes diana de un mismo grupo no están co-regulados (este es particularmente el caso de las proteínas PR, así como de las enzimas de la vía de los fenilpropanoides, para el gen PPO por un lado, PAL por otro, y por último el grupo CHS, DFR y ANS), se vuelve entonces arbitrario para seleccionar sólo uno;
- 30
- permite seguir las expresiones de varios genes diana en cada grupo, la redundancia de información sobre el nivel de expresión de más de un gen diana que pertenece a un grupo dado aumenta más la fiabilidad de los resultados.

- 35 Más precisamente, entre los genes diana anteriores, el dispositivo según la invención permite ventajosamente el estudio y/o el análisis de la expresión de una por lo menos de las combinaciones siguientes de genes:

- para el grupo (a), uno por lo menos de los genes siguientes: PR-1, PR-2, PR-4 o PR-8, combinado con uno

por lo menos de los genes siguientes PR-5, PR-14 o PR-15;

- para el grupo (b), el gen PAL, y por lo menos uno de los genes siguientes: CHS, DFR o ANS, y el gen PPO,
- para el grupo (c), por lo menos uno de los genes siguientes: HMGR y/o Far, y el gen FPPS,
- para el grupo (e), el gen APOX y por lo menos uno de los genes siguientes: GST y/o POX.

Según un modo de realización preferido, la combinación de genes diana estudiada en el dispositivo según la invención es la siguiente: PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15, PAL, CHS, DFR, ANS, PPO, HMGR, FPPS, Far, CSL, APOX, GST, POX, CalS, Pect, CAD, EDS1, WRKY, LOX2, JAR, ACCO y EIN3.

Dispositivo según la invención, y medios para determinar y/o estudiar el nivel de expresión de una combinación de genes diana según la invención

Características generales del dispositivo según la invención

La presente invención abarca el dispositivo o la herramienta, ventajosamente en forma de un estuche o de un "kit" para determinar y/o estudiar el estado de estimulación de las defensas naturales en una muestra de plantas o de partes de plantas, en particular de plantas de Rosaceae y más en particular de manzanos.

Dichos dispositivos de detección y de cuantificación se basan en la preparación de una mezcla de reacción destinada a contener los marcadores biológicos de interés y los reactivos específicos apropiados, en condiciones adaptadas y durante un tiempo suficiente para permitir que el marcador y su reactivo específico interactúen y se enlacen, y formen así un complejo que puede ser retirado y/o detectado en dicha mezcla de reacción.

El dispositivo según la invención contiene para eso unos medios adecuados para detectar cualquier marcador biológico detectable, medible y/o cuantificable, en la planta o parte de planta estudiada, que corresponde, directa o indirectamente, al nivel de expresión de cada uno de los genes seleccionados.

Según un modo de realización preferido, los ácidos nucleicos (por ejemplo ARNm o ADNc) constituyen los marcadores de expresión de cada uno de los genes diana de interés.

El método de detección del dispositivo de acuerdo con la invención se basa entonces ventajosamente en la detección de ARNm, de ADNc en la muestra.

Los medios de detección comprenden así ventajosamente unos reactivos o ligandos, o agentes o compuestos, o composiciones que comprenden, o que consisten en, un conjunto de reactivos específicos, siendo cada uno de ellos capaz de unirse específicamente con un marcador biológico de interés, ventajosamente de tipo ácido nucleico, que es representativo del nivel de expresión de uno de los genes diana.

Los reactivos adecuados para unirse con unos marcadores de tipo ácido nucleico, en particular un ARNm o un ADNc, incluyen los ácidos nucleicos de secuencias complementarias.

Por ejemplo, unos reactivos adaptados para detectar/cuantificar unos ácidos nucleicos marcadores pueden incluir (i) unos oligonucleótidos (marcados o no marcados) fijados a un soporte, (ii) unos oligonucleótidos marcados no fijados con un soporte, (iii) un par de cebadores para una técnica PCR o similar.

El estuche o el kit según la invención contiene también cualquier compuesto adicional apropiado, útil para la realización de la invención.

Por ejemplo, el dispositivo puede contener unos fluidos o unos medios para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios.

De manera general, los dispositivos en cuestión comprenden por ejemplo varios reactivos específicos que son capaces de detectar la expresión de los genes diana según la invención, que pueden ser asociados con unas muestras control, unas placas de microtitulación, unos tubos Eppendorf, un manual de empleo, etc.

Los elementos constitutivos del dispositivo según la invención se presentan más en detalle a continuación.

Medios para determinar el nivel de expresión de los genes diana en el dispositivo según la invención

El dispositivo según la invención comprende por lo tanto unos medios para cuantificar y/o determinar la expresión de los genes diana antes citados.

Así, se puede emplear en la presente memoria cualquier medio para detectar y/o cuantificar un ácido nucleico en

una muestra biológica.

En este caso, los medios de determinación del nivel o del perfil de expresión de cada gen diana se seleccionan ventajosamente de entre los fragmentos de ácido nucleico, seleccionados de entre aquellos capaces de hibridarse de manera específica a los ARNm expresados por cada uno de los genes diana, o a los ADNc correspondientes, o a fragmentos de dichos ARNm o de dichos ADNc.

En la práctica, la cuantificación del nivel de expresión de cada gen diana comprende las etapas siguientes:

(a) la preparación de una muestra de ácidos nucleicos (ARNm y/o ADNc), a partir de una planta o de una parte de planta, y

(b) la hibridación de los ARNm/ADNc de la muestra preparada, con unos medios de determinación que comprenden uno o varios reactivos de referencia (polinucleótidos de tipo sonda(s) o cebador(es) en particular) contenidos en el dispositivo según la invención.

La muestra de ácidos nucleicos se puede obtener a partir de una parte de la planta (por ejemplo una hoja, raíces, etc.), o de la planta entera (por ejemplo semillas o plantas de semillero), o de una pluralidad de plantas o de partes de plantas, tal como un lote de plantas o de hojas.

Así, en una primera fase, se extraen unas partes de plantas, y eventualmente se ponen en común, antes de las etapas de aislamiento de la muestra de ácidos nucleicos, o de las etapas de detección.

La muestra de ácidos nucleicos se extrae preferentemente de las células, por ejemplo utilizando unos métodos estándares de extracción de los ácidos nucleicos.

Unos extractos en bruto o unas muestras de tejidos en estado bruto, como por ejemplo los tejidos vegetales homogeneizados, pueden también ser utilizados como muestra de ácidos nucleicos, en la que los marcadores transcritos son detectados y/o cuantificados.

A partir de la muestra preparada, el dispositivo según la invención permite cuantificar el nivel de expresión en ARNm (o de los ADNc correspondientes), que corresponden a los genes diana antes citados.

Según un modo preferido de realización, el dispositivo según la invención está adaptado para estudiar la expresión de genes diana en base a marcadores de tipo nucleicos.

En este caso, el dispositivo se puede realizar en forma de un chip de ADN, designado también mediante las denominaciones de chip de genes o biochip, o por los términos "DNA chip", "DNA-microarray" o "biochip".

La muestra de ácidos nucleicos es preferentemente una muestra de ARNm o de ARN total o de ADNc.

Los ADNc pueden ser, de manera opcional, amplificados por la utilización de cualquier método basado en las reacciones de polimerización en cadena, antes de la hibridación con el o los polinucleótidos de referencia; de manera alternativa, estos ADNc no son amplificados.

Para la evaluación del nivel de transcripción de los genes diana en cuestión, los medios de determinación pueden basarse por ejemplo en (i) los métodos de amplificación del tipo PCR cuantitativa, preferentemente el método de RT-PCR cuantitativa, o (ii) los métodos de hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo en forma de chips de ADN o "hybridation microarray".

La PCR cuantitativa (qPCR o QPCR) se puede realizar mediante unas técnicas y equipamientos convencionales, bien conocidos por el experto en la materia, descritas por ejemplo en S.A. Bustin (Ed.), *et al.*, A-Z of Quantitative PCR, IUL Biotechnology series, n°5, 2005.

Un método posible es la PCR cuantitativa con transcripción inversa o RT-qPCR (véanse Czechowski *et al.*, 2004, Plant J. 38, 366-379; Czechowski *et al.* 2005, Plant Physiol. 139, 5-17; Vandesompele *et al.*, 2002, Genome Biol. 3(7):research0034.1-0034.11).

Esta técnica de medición permite la detección de un nivel relativo o absoluto de expresión del ARNm de los genes diana en la muestra.

Un dispositivo de este tipo que emplea una técnica de qPCR se describe más en detalle a continuación, y se presenta una aplicación práctica en los ejemplos.

De manera alternativa, la determinación se obtiene clásicamente por la puesta en contacto de la muestra de ácidos nucleicos con un soporte en el que se fijan una pluralidad de polinucleótidos que comprenden unas secuencias

complementarias (por ejemplo por lo menos 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500 o más residuos o bases nucleotídicas) a la secuencia de cada uno de los ácidos nucleicos o polinucleótidos marcadores.

Estos polinucleótidos fijados comprenden una secuencia que posee una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para formar un complejo de hibridación con el marcador nucleico de un gen diana.

Según la presente invención, el marcador específico del gen diana puede ser (i) una secuencia nucleotídica comprendida en un ARN mensajero procedente del gen diana (se habla entonces de ARNm específico del gen diana), (ii) una secuencia nucleotídica comprendida en un ADN complementario obtenido por transcripción inversa de dicho ARN mensajero (se habla entonces de ADNc específico del gen diana), o también (iii) una secuencia nucleotídica comprendida en un ARN complementario obtenido por transcripción de dicho ADNc, tal como se ha descrito anteriormente (se hablará entonces de ARNc específico del gen diana).

Aunque los diferentes polinucleótidos marcadores fijados son detectables independientemente sobre un mismo soporte (por ejemplo por la utilización de diferentes cromóforos o fluoróforos, o fijados en diferentes posiciones seleccionadas de dicho soporte), los niveles de expresión de una pluralidad de marcadores pueden ser estudiados simultáneamente sobre este soporte único.

Unos métodos apropiados para la detección y la cuantificación por biochips de polinucleótidos fijados están descritos en el estado de la técnica y pueden por ejemplo ser encontrados en: Applications of DNA Microarrays in Biology. R.B. Stoughton (2005), Annu. Rev. Biochem. 74:53-82, o en David Bowtell and Joseph Sambrook, DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003 ISBN 0-870969-625-7.

Para construir dicho chip de ADN fijado, se enlazan unas moléculas de ácido nucleico a un soporte sólido en sitios conocidos o "direcciones".

Las moléculas de ácido nucleico fijadas son complementarias de las secuencias nucleotídicas según la invención, y en particular de las secuencias SEC ID nº 1 a 28, y se conoce el emplazamiento de cada ácido nucleico sobre el chip.

Estos chips con polinucleótidos fijados pueden, por ejemplo, ser realizados utilizando unos métodos (i) de depósito de sondas pre-sintetizadas, (ii) de síntesis *in situ* o (iii) de fotolitografía.

Los métodos para generar unos polinucleotídicos marcados y para la hibridación de estos chips de ADN son bien conocidos en la técnica anterior (véanse por ejemplo los documentos US 2002/0144307, y Ausubel *et al.*, Eds. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols (Greene Publishing Associates, Inc, y John Wiley & Sons, Inc, New York, 1994 Supplement)).

En el dispositivo según la invención, la hibridación entre dos ácidos nucleicos está ventajosamente realizada en condiciones de hibridación rigurosas.

El nivel de expresión, obtenido por la aplicación del dispositivo según la invención, se puede expresar con una unidad arbitraria que refleja la cantidad de ARN mensajero transcrito para cada gen de interés, tal como la intensidad de una señal radioactiva o fluorescente emitida por el material ADNc generado por un análisis PCR del contenido en ARN mensajero de la muestra estudiada, que incluye unas técnicas de análisis PCR en tiempo real del ARN mensajero contenido en la muestra.

Aún de manera alternativa, este valor de la expresión de los genes se puede expresar como una unidad arbitraria corregida por el nivel de expresión de uno o varios genes de referencia denominados "reporteros") que no están modificados en la muestra por el estado de estimulación de las defensas naturales.

En este último caso, el valor de la expresión de cada gen diana se puede expresar como la diferencia (deltaCT) entre (i) la cantidad de un ARNm que forma un marcador biológico y (ii) la cantidad de un ARNm no marcador, presente en la muestra seleccionada por ejemplo entre los genes que corresponden a la tubulina, la actina, la GAPDH o la ubiquitina.

Para ello, se puede hacer referencia también a los documentos siguientes: Livak *et al.* (2001, Methods 25:402-408) o Vandesompele *et al.* (2002, Genome Biol. 3(7): research0034.1-0034.11).

A continuación se detallan dos dispositivos preferidos, sin que ello constituya una limitación en las técnicas susceptibles de ser empleadas para el dispositivo según la invención.

Cuantificación biológica de transcritos marcadores, por amplificación de ácidos nucleicos.

El dispositivo según la invención comprende ventajosamente unos medios para determinar el nivel de expresión de la combinación antes citada de genes diana, por amplificación de ácidos nucleicos transcritos (ARNm o ADNc) en el

ámbito de una técnica denominada de PCR cuantitativa.

La reacción de polimerización en cadena (PCR o "Polymerase Chain Reaction") es un método altamente eficaz para dicha cuantificación de ácidos nucleicos que constituyen los marcadores biológicos.

Para realizar dichas amplificaciones de ácidos nucleicos en un objetivo de cuantificación de los marcadores biológicos de interés, los medios de determinación según la invención comprenden un conjunto de pares de cebadores, siendo cada par de cebadores adecuado para fijarse y amplificar específicamente con una diana ARNm o con una diana ADNc.

Según esta técnica, los ARN totales son extraídos y purificados, y los ARN mensajeros contenidos en el extracto son ventajosamente convertidos en una primera fase en ADN complementarios (ADNc), con la ayuda de una transcriptasa inversa.

Un par de cebadores capaz de hibridarse específicamente con cada uno de los ácidos nucleicos marcadores puede ser diseñado mediante cualquier método apropiado, conocido en la técnica.

Los dos cebadores se seleccionan respectivamente en las cadenas sentido y antisentido, con el fin de permitir la amplificación de un fragmento de ADN.

Unos pares de cebadores degenerados o específicos para la amplificación de los ácidos nucleicos SEC ID nº 1 a 28 (o de una parte o de una variante de estas secuencias) pueden ser sintetizados a partir de dichas secuencias, o variantes de dichas secuencias.

Ventajosamente, los cebadores sentido y antisentido comprenden por lo menos 15 nucleótidos y presentan una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 90% y aún más preferentemente el 95%, y más preferentemente el 100%, con la secuencia de los genes diana, o con su secuencia complementaria, o con los ADNc antes citados.

Unos ejemplos de tales cebadores específicos de cada una de las secuencias SEC ID nº 1 a 28 son designados por las secuencias SEC ID nº 32 a 87 (tabla 3 en la parte Ejemplo).

Además, unos ejemplos de cebadores específicos de los genes de referencia SEC ID nº 29 a 31 son designados por las secuencias SEC ID nº 88 a 93 (tabla 3).

Los medios de determinación comprenden también unas polimerasas, preferentemente la Taq polimerasa, pero puede ser cualquier otra enzima que presenta una actividad polimerasa y utilizable en las condiciones de realización de la PCR.

Durante la reacción de amplificación, se detecta el producto de reacción, designado también bajo la denominación de amplímero o amplicón.

La cantidad de ARNm transcrito para cada gen diana se mide mediante unos medios que permiten la aplicación del método denominado de PCR cuantitativa o QPCR.

La PCR cuantitativa permite la cuantificación de una cantidad inicial de ADN, ADNc o ARN en la muestra preparada.

Para ello, se basa en la detección de un compuesto fluorescente reportero, cuya intensidad de señal aumenta cuando el producto de la PCR se acumula con cada ciclo de amplificación.

Los medios de determinación comprenden así unos compuestos fluorescentes reporteros, es decir unos compuestos que se enlazan al ADN bicatenario (por ejemplo en el caso de una técnica SYBR Green I) o unas sondas específicas (por ejemplo en el caso de una técnica TaqMan[®], de una técnica HybProbes (FRET) o hibridación de 2 sondas, de una técnica Molecular Beacons o balizas moleculares, y de una técnica Scorpion o cebadores Escorpion).

Para aplicar esta técnica PCR en el ámbito de la presente invención, se puede hacer referencia a las revisiones generales sobre las técnicas PCR y a las instrucciones de los fabricantes y distribuidores de reactivos y de termocicladores, y en particular a la noticia explicativa titulada "Quantitation of DNA/RNA Using Real-Time PCR Détection" publicada por Perkin Elmer Applied Biosystems (1999) y al PCR Protocols (Académie Press New-York 1989).

Se pueden emplear también las informaciones desarrolladas en particular en los documentos siguientes: Livak *et al.* (2001, Methods 25:402-408) y Vandesompele *et al.* (2002, Genome Biol. 3(7):research0034.1-0034.11).

Una de las ventajas del método de detección por QPCR es que el análisis de los productos de PCR se lleva a cabo directamente durante los ciclos de PCR, por la lectura de la fluorescencia obtenida durante los ciclos. Por lo tanto,

no es necesario trabajar con los productos de PCR, que constituyen un riesgo de contaminación para los análisis ulteriores. Esta detección tiene lugar ventajosamente en plena fase exponencial de PCR y no en el punto final; este principio de detección es por lo tanto más sensible y más específico.

- 5 Además, la cuantificación del número de dianas iniciales en la reacción es muy fiable y reproducible. La detección del producto de PCR se realiza durante los ciclos PCR.

Un modo de realización particular para la cuantificación de dichos marcadores biológicos, en base a un dispositivo que utiliza una técnica de cuantificación por amplificación, se da a conocer en los ejemplos siguientes.

10

Planta o parte de planta estudiada mediante el dispositivo según la invención

El dispositivo según la invención se muestra en particular interesante para el estudio de plantas, o de partes de plantas, que pertenecen a la familia de las Rosaceae o Rosáceas.

15

Este dispositivo será en particular interesante para estudiar unas plantas, o partes de plantas, seleccionadas de entre una de las sub-familias siguientes: las *Amygdaloideae* (familia del melocotón), las *Maloideae* (familia del manzano), las *Rosoideae* (familia del rosa) y las *Spiraeoideae* (familia de la espírea).

20

Más precisamente aún, el dispositivo según la invención será interesante para estudiar unas plantas, o partes de plantas, seleccionadas de entre uno de los géneros siguientes: *Acaena*, *Adenostoma*, *Agrimonia*, *Alchemilla*, *Amelanchier*, *Aphanes*, *Arenaria*, *Aria*, *Aruncus*, *Bencomia*, *Brachycaulos*, *Cercocarpus*, *Chaenomeles*, *Chamaebatia*, *Chamaebatiaria*, *Chamaemeles*, *Chamaemespilus*, *Chamaerhodos*, *Cliffortia*, *Coleogyne*, *Coluria*, *Cormus*, *Cotoneaster*, *Cowania*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Dalibarda*, *Dichotomanthes*, *Docynia*, *Docyniopsis*, *Dryas*, *Duchesnea*, *Eriobotrya*, *Eriolobus*, *Exochorda*, *Fallugia*, *Filipendula*, *Fragaria*, *Geum*, *Gillenia*, *Guamatela*, *Hagenia*, *Hesperomeles*, *Heteromeles*, *Holodiscus*, *Horkelia*, *Horkeliella*, *Ivesia*, *Kageneckia*, *Kelseya*, *Kerria*, *Leucosidea*, *Lindleya*, *Luetkea*, *Lyonothamnus*, *Maddenia*, *Malacomeles*, *Malus*, *Margyricarpus*, *Mespilus*, *Neillia*, *Neviusia*, *Nuttalia*, *Oemleria*, *Orthurus*, *Osteomeles*, *Pentactina*, *Peraphyllum*, *Petrophytum*, *Photinia*, *Physocarpus*, *Polylepis*, *Potanina*, *Potentilla*, *Poterium*, *Prinsepia*, *Prunus*, *Pseudocydonia*, *Purshia*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Quillaja*, *Rhaphiolepis*, *Rhodotypos*, *Rosa*, *Rubus*, *Sanguisorba*, *Sarcopoterium*, *Sibbaldia*, *Sibiraea*, *Sorbaria*, *Sorbus*, *Spenceria*, *Spiraea*, *Spiraeanthus*, *Stephanandra*, *Taihangia*, *Tetraglochin*, *Torminalis*, *Vauquelinia*, *Waldsteinia*, *Xerospiraea*.

25

30

35

Preferentemente, el dispositivo según la invención está adaptado para estudiar unas plantas, o partes de plantas, que pertenecen a una de las especies siguientes: *Prunus armeniaca*, *Prunus dulcis*, *Prunus avium*, *Cydonia oblonga*, *Rosa canina*, *Fragaria*, *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus* agg, *Mespilus germanica*, *Prunus persica*, *Rubus chamaemorus*, *Pyrus communis*, *Malus domestica*, *Prunus domestica*.

40

Aún más preferentemente, el dispositivo está destinado al estudio del manzano, o *Malus domestica*.

45

Método que utiliza el dispositivo según la invención

De manera general, el dispositivo según la invención se puede emplear para el estudio del estado de estimulación de las defensas naturales en una planta o una parte de la planta (o una pluralidad de plantas o de partes de plantas).

50

En la práctica, el perfil de expresión de una pluralidad de muestras de ácidos nucleicos, que proceden de varias plantas y/o partes de plantas, se determina por medio de un dispositivo o de una serie de dispositivos según la invención.

55

Este comportamiento permite tener en cuenta unas eventuales variaciones en la expresión de los genes entre las plantas y/o partes de plantas, y así obtener unos resultados fiables.

Paralelamente, se estudian y se analizan ventajosamente unas muestras control con los dispositivos según la invención.

60

Por ejemplo, las muestras de control (o las muestras de referencia) se pueden obtener a partir de plantas o de partes de plantas cuyo estado de estimulación de las defensas naturales es conocido.

Así, las muestras de control pueden proceder de plantas o de partes de plantas que son no tratadas y no estresadas, o que son sometidas previamente a un compuesto estimulador de las defensas naturales y/o un estrés.

65

Después, con el fin de determinar el estado de estimulación de las defensas naturales de vegetales de interés (que tienen un estado de estimulación de las defensas naturales desconocido), las muestras obtenidas a partir de estas

plantas o partes de plantas se compararán con unas muestras que proceden de plantas o partes de plantas cuyo estado de estimulación de las defensas naturales es conocido.

Así, se pueden analizar varias muestras por medio del dispositivo según la invención, tales como unas muestras de ácidos nucleicos que proceden (i) de plantas o partes de plantas cuyo estado de estimulación de las defensas naturales es conocido, (ii) de plantas o partes de plantas cuyo estado de estimulación de las defensas naturales es desconocido, (iii) de plantas o partes de plantas sometidas previamente a por lo menos un estrés biótico y/o abiótico o (iv) de plantas o partes de plantas sometidas previamente a por lo menos un producto para verificar o buscar un efecto estimulador de las defensas naturales.

El dispositivo según la invención puede así ser utilizado en un conjunto de procedimiento, algunos de los cuales se presentan en detalle a continuación.

Procedimiento para identificar un perfil de expresión de una combinación de genes dianas

Una primera aplicación del dispositivo según la invención es la identificación de perfiles de expresión de la combinación antes citada de genes diana, también designados "firmas" que permitirían determinar, o por lo menos evaluar, el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas.

El procedimiento para identificar un perfil de expresión de una combinación de genes diana comprende las etapas siguientes:

(i) determinar el perfil de expresión de una combinación de genes diana por medio del dispositivo según la invención, sobre un conjunto de plantas, o partes de plantas, que pertenece ventajosamente a la familia de las *Rosaceae* cuyo estado de estimulación de las defensas naturales es conocido, y después

(ii) determinar un perfil de expresión de interés de dicha combinación de genes diana que corresponde a un estado determinado de estimulación de las defensas naturales de dichas plantas o partes de plantas, que parte de los datos procedentes de la etapa (i).

Por medio del dispositivo según la invención y durante la etapa (i), se obtiene por lo menos un valor cuantitativo de expresión para cada uno de los marcadores biológicos utilizados.

La obtención de varios valores cuantitativos, para cada marcador biológico utilizado, permite un pronóstico más preciso del estado de estimulación de las defensas naturales.

Estas cuantificaciones se utilizan en unas muestras de plantas o de partes de plantas cuyo estado de estimulación de las defensas naturales es conocido, seleccionadas ventajosamente de entre:

- las muestras de plantas o de partes de plantas no sometidas a un estrés y/o a un producto estimulador de las defensas naturales; o
- las muestras de plantas o de partes de plantas sometidas a un estrés; o
- las muestras de plantas o de partes de plantas sometidas a un producto estimulador de las defensas naturales.

Por ejemplo, para obtener unas muestras representativas de un estrés biótico, se puede pulverizar peróxido de hidrógeno sobre las plantas o partes de plantas.

Para obtener unos controles negativos, se puede pulverizar agua osmotizada sobre las plantas o partes de plantas.

Para obtener unas muestras representativas de una protección frente al fuego bacteriano, se puede aplicar Bion® sobre las plantas o partes de plantas.

La etapa (ii) consiste en comparar los valores cuantitativos obtenidos en la etapa (i) para cada marcador biológico.

Los valores de expresión de referencia para cada uno de los genes diana pueden así ser determinados.

Constituyen juntas "un perfil de referencia" que es pertinente para distinguir y/o identificar y/o determinar una modificación del estado de estimulación de las defensas naturales.

Cada perfil de referencia determinado para dicha combinación de marcadores biológicos está así correlacionado con un estado de estimulación de las defensas naturales.

Según un modo de realización ventajoso, los perfiles de referencia, para la combinación de marcadores biológicos

según la invención, pueden ser predeterminados por la realización de un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar por lo menos una colección de muestras de plantas o de partes de plantas, cuyo estado de estimulación de las defensas naturales está determinado;
- b) cuantificar por medio del dispositivo según la invención, para cada muestra proporcionada en la etapa a), el nivel de expresión de dichos marcadores biológicos, por el cual se obtiene una serie de valores cuantitativos para los marcadores biológicos de dicha colección de muestra;
- c) determinar, a partir de dicha serie de valores de cuantificación obtenidos al final de la etapa b), una correlación entre un perfil determinado de expresión de dichos marcadores biológicos y un estado específico de estimulación de las defensas naturales.

Algunos perfiles de expresión interesantes, obtenidos por medio del dispositivo según la invención, están presentes en los ejemplos.

Procedimiento para determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales

El dispositivo según la invención tiene también el interés de poder ser utilizado en el ámbito de un procedimiento para el análisis del estado de estimulación de las defensas naturales de una planta o parte de planta.

El procedimiento para determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales de una planta comprende las etapas siguientes:

- (i) extraer una muestra a partir de la planta o a partir de dicha parte de planta, que pertenece ventajosamente a la familia de las *Rosaceae*, que ha sufrido eventualmente cualquier tratamiento de interés (por ejemplo estrés o estimulador de las defensas naturales),
- (ii) determinar el perfil de expresión de una combinación de genes diana en dicha muestra extraída en la etapa (i), por medio del dispositivo según la invención,
- (iii) comparar el perfil de expresión obtenido en la etapa (ii) con un perfil de expresión de referencia.
- (iv) determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales de dicha planta o de dicha parte de planta, a partir de dicho perfil de expresión obtenido durante la etapa (ii).

El perfil de expresión obtenido en la etapa (ii), por medio del dispositivo según la invención, se compara con un perfil de expresión de referencia que corresponde a los valores observados para unas muestras de plantas o de partes de plantas seleccionadas ventajosamente de entre:

- las muestras de plantas o de partes de plantas no sometidas a un estrés o un estimulador de las defensas naturales; o
- las muestras de plantas o de partes de plantas sometidas a un estrés (por ejemplo *E. amylovora*); o
- las muestras de plantas o de partes de plantas sometidas a un estimulador de las defensas naturales (por ejemplo Bion®).

En particular, la sobreexpresión de por lo menos un gen diana, y más preferentemente de una combinación de genes diana, en una muestra estudiada, en comparación con muestras de plantas o de partes de plantas no sometidas a un estrés o a un estimulador de las defensas naturales, permite identificar las plantas o partes de plantas que presentan un estado de estimulación de las defensas naturales activado o inducido.

Asimismo, la expresión constante de por lo menos un gen diana, y más preferentemente de una combinación de genes diana, en una muestra estudiada, en comparación con muestras de plantas o de partes de plantas sometidas a un estrés o a un estimulador de las defensas naturales, permite identificar las plantas o partes de plantas que presentan un estado de estimulación de las defensas naturales activado o inducido.

Procedimiento para seleccionar una sustancia que tiene la propiedad de modular el estado de estimulación de las defensas naturales

Existe la necesidad de nuevos agentes estimuladores de defensas naturales, y de métodos fiables y fáciles para el cribado de un gran número de compuestos biológicos o químicos, o de composiciones, para su utilización como agentes estimuladores de defensas naturales.

Existe también la necesidad de verificar la actividad biológica de compuestos o de composiciones presentados como estimuladores de defensas naturales.

El dispositivo según la invención constituye una herramienta particularmente interesante para identificar dichos compuestos biológicos o químicos, o dichas composiciones que contienen estos compuestos biológicos o químicos, que sean capaces de estimular las defensas naturales de una planta o parte de la planta, que pertenece ventajosamente a la familia de las *Rosaceae*.

La herramienta según la invención permite en particular cribar cualquier compuesto activo o composición activa, biológica o química, empleada en el campo de la agricultura, preferentemente la arboricultura y más preferentemente en el campo de las *Maloideae*.

La identificación de dicho efecto suplementario permitiría evitar los tratamientos redundantes (en particular por la aplicación de dos compuestos que activan los mismos mecanismos de defensas) y limitar las interacciones negativas (algunos productos SDN tienen unos efectos antagonistas frente a las vías moleculares que regulan).

El procedimiento de realización del dispositivo según la invención comprende ventajosamente las etapas siguientes:

(i) la puesta en contacto, con una planta o parte de la planta (que pertenece ventajosamente a la familia de las *Rosaceae*), de uno o varios compuestos biológicos o químicos, o de composiciones que comprenden uno o varios compuestos biológicos o químicos,

(ii) la determinación del perfil de expresión de la combinación de genes diana en una muestra extraída a partir de dicha planta tratada o de dicha parte de planta tratada tras la etapa (i), por medio del dispositivo según la invención,

(iii) la comparación del perfil de expresión obtenido en la etapa (ii) con un perfil de expresión de referencia, para determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales en dicha muestra,

(iv) la selección positiva de dicha sustancia, si la comparación en la etapa (iii) muestra que dicha sustancia ensayada en la etapa (i) modula el estado de estimulación de las defensas naturales de dicha planta de semillero o de dicha parte de planta de semillero.

En la etapa (i), cualquier compuesto biológico o químico, o cualquier composición que comprende uno o varios compuestos biológicos o químicos, pueden ser puestos en contacto con las plantas o partes de plantas.

Por lo menos dos compuestos y/o composiciones diferentes pueden ser puestos en contacto simultánea o sucesivamente, con las plantas o partes de plantas.

Preferentemente, cada compuesto o composición se pone en contacto físico con una o varias plantas individuales.

Este contacto puede ser realizado también por diferentes medios, tales como la pulverización, el cepillado, la aplicación de soluciones o de sólidos en o sobre la tierra, en la fase gaseosa que rodea las plantas o partes de plantas, por inmersión, etc.

Los compuestos o composiciones ensayados pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o gaseosos.

Los compuestos o composiciones ensayados pueden ser sintetizados artificialmente o naturales, como las proteínas, fragmentos de proteínas, compuestos orgánicos volátiles, plantas o animales o extractos de microorganismo, los metabolitos, los azúcares, las grasas y aceites, los microorganismos como los virus, bacterias, hongos, etc.

El compuesto o la composición biológica comprenden también, o está constituido por, uno o varios microorganismos, o uno o varios extractos de plantas.

El perfil de expresión obtenido en la etapa (ii), por medio del dispositivo según la invención, se compara según un método descrito anteriormente, es decir por ejemplo con un perfil de expresión de referencia que corresponde a los valores observados para muestras de plantas o de partes de plantas seleccionados ventajosamente de entre:

- las muestras de plantas o de partes de plantas no sometidas a un estrés o un a estimulador de las defensas naturales; o
- las muestras de plantas o de partes de plantas sometidas a un estrés (por ejemplo *E. amylovora*); o
- las muestras de plantas o de partes de plantas sometidas a un estimulador de las defensas naturales (por ejemplo Bion®).

En particular, la sobreexpresión de por lo menos un gen diana, y más preferentemente de una combinación de genes diana, en una muestra estudiada, en comparación de muestras de plantas o de partes de plantas no sometidas a un estrés o a un estimulador de las defensas naturales, permite identificar las plantas o partes de plantas que presentan un estado de estimulación de las defensas naturales debido a la acción del compuesto ensayado o de la composición ensayada.

Por ejemplo, la sobreexpresión de la combinación de genes dianas PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, HMGR, Far, CSL, POX, Pect, EDS1 y WRKY permite seleccionar una sustancia que tiene la propiedad de generar un estado de estimulación de las defensas naturales de una planta o de una parte de planta que pertenece a la familia de las *Rosaceae*, que asegura una protección frente a un estrés biótico.

Preferentemente, este perfil de expresión permite la selección de una sustancia que tiene la propiedad de generar un estado de estimulación de las defensas naturales de una planta o de una parte de planta que pertenece a la familia de las *Rosaceae* que asegura una protección frente a *Erwinia amylovora*.

En particular, esta sobreexpresión para cada uno de los genes diana antes citados consiste en un nivel de sobreexpresión relativa (ventajosamente con respecto a un tratamiento con agua) superior a 3 (o $\log_2$ (expresión relativa) > 1,58).

Asimismo, la expresión constante de por lo menos un gen diana, y más preferentemente de una combinación de genes diana, en una muestra estudiada, en comparación con muestras de plantas o de partes de plantas sometidas a un estimulador de las defensas naturales, permite identificar las plantas o partes de plantas que presentan un estado de estimulación de las defensas naturales debido a la acción del compuesto ensayado o a la composición ensayada.

La planta o parte de planta tratada puede ser sometida eventualmente simultáneamente a un estrés abiótico (medioambiental) con el fin de estudiar el efecto de condiciones de cultivo estresantes sobre la eficacia de los estimuladores de defensas naturales.

La herramienta según la invención puede permitir seleccionar y distinguir unos compuestos estimuladores directos y unos compuestos potencializadores.

Para ello, se puede estudiar por ejemplo el cambio del perfil de expresión de los genes diana tras la aplicación de un estrés biótico, con o sin aplicación previa de un compuesto o de una composición de interés.

La sobreexpresión de una combinación de genes diana en una muestra después de la aplicación de un estrés biótico, en comparación con muestras de plantas o de partes de plantas no sometidas a tal estrés biótico, permite identificar los compuestos potencializadores (o por lo menos susceptibles de tener dicho efecto potencializador).

Procedimiento para seleccionar una planta o una parte de planta

La presente invención se refiere también a la identificación y a la selección de plantas que pertenecen ventajosamente a la familia de las *Rosaceae*, que presenta un estado particular de estimulación de las defensas naturales, ya sea este estado obtenido:

(a) naturalmente (por crecimiento o utilización de las variaciones naturales) o artificialmente (induciendo unas variaciones, por ejemplo por transgénesis de las plantas o de las partes de plantas, o por mutagénesis utilizando uno o varios agentes mutagénesis); y/o

(b) tras la aplicación de un compuesto o de una composición estimuladora de las defensas naturales; y/o

(c) tras la aplicación de uno o varios estrés biótico(s) y/o abiótico(s).

En efecto, el dispositivo según la invención constituye una herramienta interesante para seleccionar una planta, que pertenece preferentemente a la familia de las *Rosaceae*, que presenta un estado de estimulación de las defensas naturales susceptibles de conferirles una resistencia mejorada a por lo menos un estrés biótico y/o abiótico de interés.

Un método para seleccionar una planta o parte de la planta que tiene un estado de estimulación de las defensas naturales mejorado (y por lo tanto con resistencia reforzada a los estrés bióticos y/o abióticos) puede comprender las etapas siguientes:

(i) aplicar el o los estrés, y/o el o los estimuladores de defensas naturales, a una planta o una parte de planta, que pertenece ventajosamente a la familia de las *Rosaceae*,

(ii) determinar el perfil de expresión de una combinación de genes diana en una muestra extraída a partir de

dicha planta o de dicha parte de planta, por medio del dispositivo según la invención,

(iii) comparar el perfil de expresión obtenido en la etapa (ii) con un perfil de expresión de referencia, para determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales en dicha muestra,

(iv) seleccionar positivamente dicha planta si la comparación con la etapa (iii) muestra que dicha planta o dicha parte de planta posee un estado de estimulación de las defensas naturales susceptible de conferirle una resistencia mejorada a por lo menos un estrés biótico u/o abiótico de interés.

La planta o parte de la planta seleccionada en la etapa (iv) comprende ventajosamente un estado particular de estimulación de las defensas naturales en presencia de agentes estimuladores de las defensas naturales y/o de estrés biótico y/o de estrés abiótico.

El perfil de expresión obtenido en la etapa (ii), por medio del dispositivo según la invención, se compara según un método descrito anteriormente, es decir por ejemplo con un perfil de expresión de referencia que corresponde a los valores observados para unas muestras de plantas o de partes de plantas seleccionados ventajosamente de entre:

- las muestras de plantas o de partes de plantas no sometidas a un estrés o a un estimulador de las defensas naturales;
- las muestras de plantas o de partes de plantas sometidas a un estimulador de las defensas naturales; o
- las muestras de plantas o de partes de plantas sometidas a un estrés.

La sobreexpresión de por lo menos un gen diana, y más preferentemente de una combinación de genes diana, en una muestra estudiada, en comparación con muestras de plantas o de partes de plantas sometidas a un estrés o a un estimulador de las defensas naturales, permite identificar las plantas o partes de plantas que presentan un estado de estimulación de las defensas naturales susceptible de presentar una resistencia mejorada a por lo menos un estrés biótico y/o abiótico de interés.

El dispositivo según la invención permite así cribar los genotipos para su reactividad a los productos SDN.

Secuencias

SEC ID nº 1 a 31: secuencias de los ADNc procedentes de los genes diana y de los genes de referencias;

SEC ID nº 32 a 93: secuencias de cebadores PCR para la amplificación de las secuencias SEC ID nº 1 a 31.

Figuras

Figura 1: Eficacia de protección de 10 SDN candidatos contra *E. amylovora* sobre siembra de manzano. El agua y la plantomicina (Plantom.) se utilizan como controles negativos y positivos respectivamente.

RC: regulador de crecimiento; Eclairciss: aclaradores; Representación diagramas de cajas, indicando estos últimos los intervalos de confianza de las medianas ($P=0,05$); Por lo menos seis repeticiones biológicas de 10 siembras de 2 experimentos independientes.

Figura 2: A) Modulación de la expresión de los 28 genes de la herramienta en unas hojas de 4 variedades de manzano (retoños injertados) 3 días después del tratamiento con Bion o con agua. Diferencias de expresión con respecto a una extracción efectuada el D0 sobre unas plantas no tratadas de cada genotipo. Una repetición biológica. B) Eficacia media de protección frente al fuego bacteriano efectuada en paralelo ($n=12$).

Ejemplo

Material:

Dispositivo según la invención

Placa de microtitulación de 96 pocillos lista para su empleo, que contiene los pares de cebadores SEC ID nº 32 a 93 para (i) los 28 genes diana SEC ID nº 1 a 28 y (ii) los 3 genes de referencia SEC ID nº 29 a 31, (repartidos en tres pocillos por cada par) en forma deshidratada (evaporación durante una noche a 60°C) y en cantidad suficiente para alcanzar las concentraciones finales óptimas detalladas en la tabla 3 siguiente.

Tabla 3: Cebadores y concentraciones óptimas para la técnica PCR

Nombre del gen	Cebadores	SEC ID	Tamaño amplicón (pb)	Concentración óptima (nm)
----------------	-----------	--------	----------------------	---------------------------

ES 2 522 551 T3

Nombre del gen	Cebadores	SEC ID	Tamaño amplicón (pb)	Concentración óptima (nm)
PR-1	PR1-di	32	167	200
	PR1-re	33		
PR-2	PR2-di	34	152	400
	PR2-re	35		
PR-4	PR4-di	36	123	200
	PR4-re	37		
PR-5	PR5-di	38	100	600
	PR5-re	39		
PR-8	PR8-di	40	173	200
	PR8-re	41		
PR-14	PR14-di	42	192	200
	PR14-re	43		
PR-15	PR15-di	44	132	200
	PR15-re	45		
PAL	PAL-di	46	133	200
	PAL-re	47		
CHS	CHS-di	48	234	100
	CHS-re	49		
DFR	DFR-di	50	239	200
	DFR-re	51		
ANS	ANS-di	52	298	200
	ANS-re	53		
PPO	PPO-di	54	124	200
	PPO-re	55		
HMGR	HMGR-di	56	206	400
	HMGR-re	57		
FPPS	FPPS-di	58	255	200
	FPPS-re	59		
Far	Far-di	60	161	200
	Far-re	61		
CSL	CSL-di	62	134	200
	CSL-re	63		
APOX	APX-di	64	185	200
	APX-re	65		
GST	GST-di	66	185	200
	GST-re	67		
POX	POX-di	68	197	100
	POX-re	69		
CaLS	CaLS-di	70	176	200
	CaLS-re	71		
Pect	Pect-di	72	173	300
	Pect-re	73		
CAD	CAD-di	74	85	200
	CAD-re	75		
EDS1	EDS1-di	76	269	200
	EDS1-re	77		
WRKY	WRKY-di	78	171	200
	WRKY-re	79		
LOX2	LOX2-di	80	199	100
	LOX2-re	81		
JAR	JAR-di	82	118	200
	JAR-re	83		
ACCO	ACCO-di	84	193	200
	ACCO-re	85		
EIN3	EIN3-di	86	212	400
	EIN3-re	87		
TuA	TuA-di	88	118	300
	TuA-re	89		
Actin	Actin-di	90	140	100
	Actin-re	91		
GAPDH	GAPDH-di	92	103	300
	GAPDH-re	93		

Ensayo 1 - Expresión relativa de los genes de defensa en unas hojas de manzanos sometidas a diferentes tratamientos5 Protocolo:

La expresión de los 28 genes diana se siguió (i) en unas hojas de plántulas de manzano (obtenidas por polinización libre de la variedad Golden Delicious, véase Brisset *et al.* Eur. J. Plant Pathol 106, 529-536, 2000) sometidas a tratamientos de tipo SDN y a diversos estrés abióticos, así como (ii) en unas hojas de retoños injertados de dos genotipos de manzano, Everest y MM106 (véase Venisse *et al.* Molecular Plant-Microbe Interactions 15, 1204-1212, 2002), después de la infección por *Erwinia amylovora*, agente del fuego bacteriano.

El protocolo aplicado comprende las etapas 1 a 7 siguientes:

- 15 1) tratamiento de las plantas de semillero por pulverización, riego o infiltración del producto (o de agua osmotizada para los controles negativos).

Los diversos tratamientos se aplicaron de la siguiente manera:

- 20 - Baba (a.i. 95% ácido DL-β-amino-n-butírico, Sigma ref A-2004) aplicado por riego de una solución 10 mM (5 ml por maceta de 150 ml),
- Bion® (a.i. 50% acibenzolar-S-metilo, Syngenta) aplicado por pulverización hasta escurrido de una solución a 0,4 g/l,
- 25 - Rhodofix® (a.i. 1% ácido α-naftilacético, Nufarm SAS) aplicado por pulverización hasta escurrido de una solución a 1,5 g/l,
- Régalis® (a.i. 10% prohexadion-calcio, BASF Agro, BASF Agro) aplicado por pulverización hasta escurrido de una solución a 2,5 g/l,
- 30 - PRM® 12 RP (a.i. 11,3% etefón, Bayer CropScience) aplicado por pulverización hasta escurrido de una solución a 3 ml/l,
- 35 - MeJA (a.i. 95% metilo jasmonato, Aldrich ref. 39,270-7) aplicado por riego de una solución 10 mM (5 ml por maceta de 150 ml),
- deshidratación aplicada por detención del riego,
- 40 - PEG (a.i. polietilenglicol 6000, Merck ref. 807491) aplicado por imbibición hasta saturación de la tierra (2 veces 3 mn) con la ayuda de una solución al 36%,
- Paraquat (a.i. paraquat dicloruro x-hidrato PESTANAL®, Fluka ref. 36541) aplicado por pulverización hasta escurrido de una solución 100 μM,
- 45 - H₂O₂ (a.i. 30% peróxido de hidrógeno) aplicado por pulverización hasta escurrido de una solución a 10 ml/l,
- *E. amylovora* aplicado por infiltración de una suspensión de la cepa CFBP1430 añadida a 10⁷ cfu/ml.
- 50 2) Pulverización opcional de peróxido de hidrógeno 24h después de la etapa 1), para imitar el ataque por un patógeno (lo que permite diferenciar los estimuladores directos y los potencializadores).
- 3) Extracciones de tejidos 24h, 48h y 72h después del tratamiento.
- 55 4) Congelación inmediata de los tejidos en el nitrógeno líquido y conservación a -80°C.
- 5) Extracción de ARN, transcripción inversa, verificación de ausencia de ADN genómico según Venisse *et al.* (Molecular Plant-Microbe Interactions 15, 1204-1212, 2002).
- 60 6) Amplificación por PCR cuantitativa de cada extracto preparando la mezcla siguiente: 5 μg de ADNc, X μl de mezcla qPCR según las instrucciones del proveedor, y csp 2500 μl de agua ultrapura, distribuyéndolo a razón de 25 μl por pocillos de la placa de 96 pocillos listo para su empleo, y efectuando la amplificación según un programa qPCR de 40 ciclos.
- 65 7) Explotación de los resultados según el método del ΔΔCt que proporciona las expresiones relativas de los

genes de defensa en una muestra dada con respecto a una muestra no tratada denominada "calibrador", expresiones normalizadas por la media geométrica de los genes de referencia de estas muestras (Vandesompele *et al.*, Genome Biol. 3(7): research0034.1-0034.11, 2002; Livak y Schmittgen, Methods 25:402-408, 2001).

Los resultados de expresión de los 28 genes diana están detallados en las tablas 4, 5 y 6 siguientes, que consisten en una matriz de las expresiones relativas con respecto a unos controles de "agua" (extraídos en los mismos tiempos) transformados en log de base 2 (J=día, h=hora).

Estos resultados se distribuyen en tres tablas, únicamente en aras de la presentación.

Resultados

- a) los productos Bion, Rhodofix y Régalis muestran una activación bastante similar de la combinación de los genes siguientes: PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, HMGR, Far, CSL, POX, Pect, EDS1 y WRKY, con niveles de sobreexpresión relativa (con respecto al agua) frecuentemente superiores a 3 (o $\log_2$ (expresión relativa) > 1,58, tablas 4 a 6).

Estos tres productos aseguran por otra parte una protección significativa y reproducible frente al fuego bacteriano.

Es interesante señalar que entre estos 3 productos, sólo el Bion (análogo del ácido salicílico) está homologado como SDN (en unas especies diferentes del manzano).

Los inventores han mostrado ya su eficacia de protección frente al fuego bacteriano, pero también frente a la sarna del manzano y el pulgón ceniciento, protección correlacionada con la acumulación de algunas proteínas de defensas (Brisset *et al.*, 2000 y 2005).

El Rhodofix (análogo de auxina) es un aclarador utilizado en los huertos de manzano para aligerar la carga en frutos.

Según los presentes ensayos, este producto tendría asimismo unos efectos de estimulación de defensa, lo cual nunca se ha descrito.

En cuanto al Régalis (inhibidor de giberelinas por inhibición de dioxigenasas), éste se utiliza también en los huertos de manzano como reductor de crecimiento de los brotes.

Los inventores han demostrado ya su capacidad de protección frente al fuego bacteriano, que podía estar relacionada con la reducción de crecimiento (Brisset *et al.*, 2005).

Los análisis de expresión de genes muestran que tiene asimismo la capacidad de inducir unas defensas, en particular de tipo proteínas PR, lo cual, una vez más, no se ha descrito jamás.

- b) los dos productos MeJA y PRM 12 muestran por su lado una activación bastante similar de una combinación de genes de defensa: PR-14, PAL, CHS, DFR, CSL, Pect, ACCO y EIN3 con unos niveles de sobreexpresión relativa con respecto al agua frecuentemente superiores a 3 (o $\log_2$ (expresión relativa) > 1,58, tablas 4 a 6).

A nivel de protección, estos dos productos muestran una eficacia muy variable según los ensayos, pero, en el mejor de los casos, no alcanza jamás la eficacia de los productos Bion, Rhodofix y Régalis.

Se señala que PRM 12 (análogo del etileno) es asimismo un aclarador utilizado en los huertos de manzano.

A la vista de los presentes resultados, el Rhodofix se debería de preferir al PRM 12 por su doble función de aclarador y de estimulador de defensas.

- c) el Baba aplicado en las condiciones experimentales (riego) en el marco de la presente memoria muestra poco efecto sobre las modulaciones de genes y ningún efecto de protección frente al fuego bacteriano.

Por lo tanto, representa un control negativo en los experimentos. Valida asimismo la utilización de H₂O₂ en el modo de realización. En efecto, el Baba se conoce como potencializador y no como estimulador directo, siendo su acción sobre las defensas revelada sólo después del estrés provocado por un agente patógeno.

En este modo de realización, la acción de este último está estimulada por la aplicación de H₂O₂. Los resultados muestran bien que este tratamiento suplementario activa la expresión de algunos genes (POX, Pect por ejemplo) que no son activados por el único tratamiento Baba.

Este fenómeno no obstante no se observa claramente para los otros estimuladores, que parecen por lo tanto ser más bien unos estimuladores directos.

- d) Visto en su conjunto, los resultados obtenidos con los 6 productos tipo SDN parecen indicar que la sobreexpresión de los genes PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, HMGR, Far, CSL, POX, Pect, EDS1 y WRKY (ventajosamente con niveles de expresión relativa, con respecto al agua, superiores a 3) permite asegurar una protección significativa frente al fuego bacteriano en condiciones controladas.

Sin embargo, la sobreexpresión de los genes PR-14, PAL, CHS, DFR, CSL, Pect, ACCO y EIN3 (con niveles de expresión relativa con respecto al agua ventajosamente superiores a 3) no permite asegurar esta protección.

- e) los estrés abióticos se han aplicado para responder a dos preguntas: i) ¿se pueden tener unos artefactos sobre la expresión de los genes de defensa si los experimentos de productos tipo SDN se desarrollan en condiciones medioambientales más difíciles para las plantas? (es decir observar unas activaciones de genes que se deben a las condiciones estresantes y no a los SDN) y ii) ¿unas condiciones medioambientales estresantes impiden la reacción de las plantas a los SDN? (lo cual tendría entonces un impacto para el éxito de los tratamientos en huertos).

Los resultados actuales responden en parte a la primera pregunta. Los estrés hídricos (deshidratación), osmóticos (PEG) y poco oxidantes (H_2O_2 - que sirven también de control para los ensayos de potencialización) modulan sólo débilmente las expresiones de los genes diana. Sólo un fuerte estrés oxidante (paraquat = herbicida que provoca la producción de ion superóxido) activa fuertemente algunos genes pero en su conjunto, las activaciones son más débiles que las obtenidas con el Bion por ejemplo.

- f) las respuestas de los genes a una infección por *E. amylovora* muestran que esta bacteria modula en el conjunto los mismos genes diana que los tratamientos Bion, Rhodofix o Régalis, pero frecuentemente con una amplitud más baja, en particular para los genes de proteínas PR.

Como la bacteria reprime en gran medida los genes de las vías del ácido jasmónico y de los fenilpropanoides, se podría esperar que los productos que provocan el efecto inverso de tipo MeJA o PRM 12 sean eficaces en términos de protección, lo cual no es el caso en nuestras condiciones experimentales.

Los resultados en su conjunto muestran, al contrario, que los productos que aseguran una protección significativa activan la misma combinación de genes que la bacteria en sí (PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8 PR-14 HMGR Far, CSL, POX, Pect EDS1 y WRKY).

Tabla 4

Expresión relativa de los genes de defensa en unas hojas de manzanos sometidas a diferentes tratamientos (SDN potenciales, estrés abióticos, infección por *E. amylovora*)

Tratamientos	Tiempo de extracción	PR-1	PR-2	PR-4	PR-5	PR-8	PR-14	PR-15	PAL	ANS	
Baba	-H ₂ O ₂	D2	1,85	3,04	3,00	2,75	0,02	-0,29	1,84	0,42	1,28
		D2	-0,70	0,24	-0,71	0,92	0,10	-2,34	-0,53	0,27	1,53
		D3	0,01	0,20	-2,45	-0,26	-0,37	-3,35	0,04	0,20	-1,09
		D3	2,08	-1,69	-0,57	0,86	-0,52	3,90	1,82	0,29	-0,10
	+H ₂ O ₂	D2	5,93	8,90	6,58	2,84	3,33	6,56	084	029	1,41
		D2	0,08	-0,98	0,16	0,40	0,39	-2,63	0,71	0,55	2,12
		D3	2,71	4,26	-2,18	1,91	1,39	-0,53	1,46	-0,84	0,19
		D3	1,77	-2,32	-0,86	1,34	-1,00	1,17	2,06	-0,12	1,25
Bion	-H ₂ O ₂	D2	8,37	6,89	8,61	5,77	6,07	3,31	1,88	-0,14	1,51
		D2	3,20	9,64	7,17	1,02	3,50	3,75	1,61	1,11	0,21
		D3	5,99	7,99	5,43	4,46	2,23	4,09	-1,98	-1,29	-1,56
		D3	2,14	1,61	8,07	3,88	1,62	049	4,96	-0,15	0,14
	+H ₂ O ₂	D2	8,53	11,96	10,25	6,52	5,57	2,22	4,09	-0,25	-0,15
		D2	3,87	6,36	5,10	2,43	3,25	2,95	1,72	1,91	1,50
		D3	7,66	13,12	6,37	4,11	2,74	5,01	1,33	-2,25	-4,05
		D3	5,35	7,07	8,03	5,68	3,62	4,52	3,60	0,83	0,14
Rhodofix	-H ₂ O ₂	D2	2,61	9,34	6,87	1,75	3,16	5,43	0,98	1,78	2,40
		D3	5,99	7,56	9,06	3,15	3,56	6,59	2,93	0,32	0,77
	+H ₂ O ₂	D2	3,87	6,85	7,42	2,72	3,19	4,49	4,83	1,15	149
		D3	6,47	6,19	8,82	3,13	3,74	4,29	3,15	0,14	1,29
Régalis	-H ₂ O ₂	D2	4,76	3,80	3,25	2,42	4,07	7,55	2,77	0,22	1,31
		D2	2,08	5,91	3,45	-0,84	2,29	3,31	1,12	1,36	0,77

Tratamientos	Tiempo de extracción	PR-1	PR-2	PR-4	PR-5	PR-8	PR-14	PR-15	PAL	ANS
	D3	3,62	4,38	3,09	0,96	1,36	079	-0,08	0,64	-0,05
	D3	4,11	3,84	3,80	122	1,91	6,20	1,37	0,58	2,70
	+H ₂ O ₂	D2	4,02	11,09	8,82	4,24	4,07	5,07	0,63	0,81
		D2	1,85	1,57	6,39	-1,92	2,72	4,80	6,12	2,69
		D3	4,00	8,88	2,56	1,46	1,00	4,66	3,73	-0,51
PRM12		D3	1,99	0,07	2,72	1,66	-0,39	2,50	0,54	0,06
	-H ₂ O ₂	D2	0,34	2,00	0,96	0,61	0,37	0,16	0,30	0,41
		D3	1,13	-1,11	5,13	-0,73	2,56	5,92	5,40	4,10
	+H ₂ O ₂	D2	2,41	1,94	0,14	-0,17	0,91	1,90	2,46	1,38
		D3	1,89	-2,70	0,21	1,64	-0,30	5,05	3,13	-0,33
MeJA	-H ₂ O ₂	D2	1,56	4,03	2,68	-0,59	1,85	3,45	-0,19	3,17
		D3	2,35	3,69	2,63	1,49	1,00	5,09	1,21	1,66
	+H ₂ O ₂	D2	0,40	3,89	1,25	-2,09	1,41	-0,64	3,20	3,36
		D3	2,84	0,66	2,84	-1,22	1,51	3,66	2,77	2,01
Deshidratación		D2	-2,01	-1,80	-4,15	0,57	0,39	-2,11	1,82	-2,26
		D4	-0,91	-1,65	-4,21	0,00	0,00	-0,56	0,00	-0,12
		D7	1,12	-1,28	-4,36	1,20	0,70	2,71	3,01	-1,54
		D10	0,47	-1,06	-3,33	2,49	2,15	3,09	2,66	-2,12
PEG		D1	2,56	4,72	3,01	0,00	0,00	1,46	0,00	0,41
		D2	4,07	0,29	1,00	-3,97	-1,15	6,49	-0,87	0,20
		D2	-2,07	-2,05	-5,05	1,44	0,15	3,82	1,10	-4,43
		D3	1,07	0,69	3,92	-11,1	1,75	5,87	-6,54	0,68
		D4	-1,32	-1,24	1,64	-0,20	1,60	5,33	1,83	-0,64
		D7	0,92	-2,37	0,03	-1,07	1,52	8,06	1,51	-2,10
		D10	0,16	-1,62	2,30	-1,38	1,63	5,71	1,61	-2,72
Paraquat		D1	0,55	4,09	7,10	0,00	0,00	2,61	0,00	1,99
		D2	3,00	5,88	6,93	-3,05	5,12	6,04	4,77	2,56
		D3	0,54	2,53	6,63	-8,56	5,36	1,28	-0,34	0,66
H ₂ O ₂		D2	2,44	4,75	2,53	3,02	0,83	-1,92	-0,20	1,91
		D2	-2,09	3,92	4,27	-0,64	0,79	-1,17	1,35	0,91
		D3	0,66	2,36	-2,25	0,41	0,38	0,70	-0,82	-0,87
		D3	4,31	3,38	6,36	4,37	2,00	3,18	1,32	-0,06
<i>E. amylovora</i>		6h	4,82	7,68	6,71	1,45	5,90	4,20	6,54	1,49
		6h	1,56	1,28	4,30	5,49	6,86	3,90	4,82	0,87
		24h	5,24	3,14	5,19	1,98	5,04	3,90	9,64	0,44
		24h	4,18	-0,65	2,91	-0,65	3,82	2,00	9,00	-0,63

Tabla 5

Expresión relativa de los genes de defensa en unas hojas de manzanos sometidas a diferentes tratamientos (SDN, estrés abióticos, infección por *E. amylovora*)

5

Tratamientos	Tiempo de extracción	CHS	DFR	PPO	HMGR	FPPS	Far	CSL	APOX	GST
Baba	-H ₂ O ₂	D2	0,27	0,64	-0,06	1,22	-0,02	0,85	-0,37	0,02
		D2	0,29	0,93	-1,07	-0,67	-0,41	0,28	0,38	2,14
		D3	0,19	-0,02	0,54	1,95	0,46	0,81	0,55	-1,18
		D3	0,31	0,72	1,24	-0,52	0,56	-1,03	1,34	0,11
	+H ₂ O ₂	D2	-0,50	-0,28	-2,03	2,50	0,60	1,91	1,50	1,49
		D2	1,18	1,17	-1,09	-1,67	-0,79	-1,50	0,36	1,76
		D3	-0,47	0,42	-0,67	1,98	1,46	1,25	-0,34	1,20
		D3	0,12	0,73	1,87	-0,09	-0,08	-0,31	0,56	2,41
Bion	-H ₂ O ₂	D2	-0,36	-0,09	1,78	3,27	-1,44	4,65	4,37	1,49
		D2	1,50	2,12	5,84	2,30	1,01	2,22	4,44	0,11
		D3	-1,36	-0,49	1,65	4,30	1,59	3,82	4,71	-0,34
		D3	-0,95	-0,13	4,27	1,21	0,74	2,13	4,05	1,09
	+H ₂ O ₂	D2	-0,87	1,18	-0,39	5,25	1,78	4,75	5,08	1,98
		D2	1,57	1,44	2,22	1,04	0,26	3,69	2,97	-0,06
		D3	-1,81	0,16	2,35	6,40	2,38	3,03	6,33	-0,37
		D3	0,03	1,38	3,84	2,82	1,75	2,30	3,97	2,74
Rhodofix	-H ₂ O ₂	D2	1,79	2,28	1,63	0,93	-0,45	1,98	2,99	-1,09
		D3	0,60	1,89	3,86	1,57	0,54	2,53	4,13	-1,04
	+H ₂ O ₂	D2	1,71	1,74	1,84	0,13	-0,21	1,64	2,93	0,34

ES 2 522 551 T3

Tratamientos	Tiempo de extracción	CHS	DFR	PPO	HMGR	FPPS	Far	CSL	APOX	GST
	D3	0,50	1,68	3,01	1,52	0,55	1,71	4,55	-0,20	1,18
Régalis	-H ₂ O ₂	D2	0,16	0,63	-0,16	1,72	0,11	2,12	0,35	1,09
		D2	1,83	2,13	0,41	-0,04	-0,22	0,76	1,87	0,39
		D3	0,22	0,67	0,57	2,90	1,42	1,79	1,90	-0,73
		D3	0,83	2,32	1,15	0,31	0,14	-0,20	2,15	-1,34
	+H ₂ O ₂	D2	0,14	0,67	-1,85	3,50	1,10	2,43	1,63	1,63
		D2	2,88	3,35	4,53	-0,92	0,22	0,59	3,11	0,79
		D3	0,85	2,57	-0,43	3,49	2,97	2,62	2,12	-0,69
		D3	0,18	0,51	1,47	-0,29	0,09	-0,42	1,18	-3,31
PRM12	-H ₂ O ₂	D2	0,08	0,23	1,59	0,23	0,46	-0,18	0,59	0,53
		D3	3,78	4,60	5,67	1,41	0,62	0,57	4,12	1,15
	+H ₂ O ₂	D2	1,96	1,98	-0,58	-1,17	1,18	-1,85	1,90	1,01
		D3	0,23	1,10	0,63	0,09	0,30	-1,62	1,42	-1,91
MeJA	-H ₂ O ₂	D2	2,97	2,92	1,28	1,49	0,00	2,34	2,29	-3,00
		D3	1,22	1,55	0,78	1,16	0,13	1,51	1,81	0,95
	+H ₂ O ₂	D2	3,73	3,43	0,80	-0,38	-0,07	0,74	2,26	1,87
		D3	1,47	1,36	1,23	0,60	0,43	0,39	1,46	2,11
Deshidratación	D2	0,73	1,83	-1,22	0,38	-1,48	2,62	-0,41	-1,40	-2,02
	D4	2,34	2,06	-0,69	1,55	-2,61	0,92	-0,86	0,00	-3,05
	D7	1,45	2,08	-0,74	1,05	-2,70	2,51	-0,10	0,54	-1,37
	D10	1,08	1,87	-0,14	1,28	-3,63	1,64	0,50	1,90	-1,55
PEG	D1	0,93	0,87	0,37	-1,18	-0,12	3,26	1,24	0,00	0,20
	D2	0,05	1,12	0,35	-0,87	0,29	0,96	1,18	2,38	-0,01
	D2	-0,67	0,78	1,76	1,66	-2,51	1,06	-0,15	-1,37	-0,73
	D3	0,64	2,42	-1,57	0,20	-0,79	1,45	2,23	1,31	-0,39
	D4	1,96	1,80	1,17	1,33	-3,95	-1,20	1,20	-0,35	-0,71
	D7	1,74	1,83	-2,02	-0,07	-4,15	0,18	0,75	0,68	-0,79
	D10	1,09	1,00	1,22	0,45	-4,63	-2,01	1,65	-1,06	-0,82
Paraquat	D1	-1,56	-0,74	0,67	2,85	1,02	2,76	2,29	0,00	1,99
	D2	-1,49	-1,14	6,27	1,20	0,15	2,30	4,42	2,01	1,83
	D3	-2,04	-2,09	4,63	-0,24	-1,83	1,85	5,43	1,48	0,80
H ₂ O ₂	D2	0,35	0,50	-1,99	2,70	1,94	2,37	0,53	0,41	-0,81
	D2	1,33	0,80	-0,71	-0,07	-1,18	-0,97	-0,02	0,38	-0,02
	D3	-0,51	-0,73	-1,75	3,13	1,96	0,51	-0,38	-1,38	0,33
	D3	-0,09	0,57	1,24	1,37	0,85	2,02	1,64	0,77	0,40
<i>E. amylovora</i>	6h	-2,67	-1,16	6,27	4,71	5,12	6,13	4,94	-2,33	4,10
	6h	-4,28	-4,32	6,18	2,86	2,64	4,46	3,90	0,61	2,53
	24h	-1,32	-0,16	7,60	3,71	2,52	3,58	5,20	-0,82	3,24
	24h	-2,85	-1,79	8,04	2,68	1,78	5,68	3,70	-2,17	3,43

Tabla 6

Baba	-H ₂ O ₂	J2	0,44	-0,45	0,19	-0,04	0,41	-1,51	0,37	-0,80	0,10	-0,09
		J2	1,57	0,26	0,66	-1,38	0,08	-0,34	-0,61	0,56	-0,26	3,15
		J3	-1,16	0,71	0,00	-0,73	0,16	-1,33	-0,69	-0,29	0,00	-0,65
		J3	0,95	-0,30	0,35	1,66	-1,70	2,55	0,09	0,29	0,43	0,41
	+H ₂ O ₂	J2	2,20	-0,87	0,75	2,04	1,13	0,34	0,10	-0,44	1,14	0,60
		J2	2,28	-0,16	0,44	-1,76	-0,69	-1,71	-0,41	-0,16	2,13	1,94
		J3	1,41	-0,15	2,10	2,96	0,97	0,27	-0,62	1,52	0,64	1,69
		J3	3,22	-0,29	1,88	2,11	-0,58	-0,35	0,09	1,02	2,14	1,32
Bion	-H ₂ O ₂	J2	3,76	-0,36	1,31	2,63	3,21	1,67	-0,75	-1,13	1,28	-0,64
		J2	2,77	0,56	-0,27	-0,32	3,65	4,54	-1,00	-1,32	2,24	2,03
		J3	3,56	-0,30	0,49	1,61	3,26	2,22	-1,18	-0,57	1,36	0,05
		J3	4,65	0,34	0,89	0,99	2,50	4,79	0,00	-0,62	0,69	0,22
	+H ₂ O ₂	J2	4,75	-1,34	0,97	2,35	3,50	2,08	-1,78	-1,39	1,60	-0,09
		J2	1,76	0,28	0,06	0,50	2,74	3,47	0,31	-0,32	3,40	2,22
		J3	1,72	-1,08	0,94	1,89	4,09	1,77	-1,71	-1,46	1,78	-0,70
		J3	5,67	0,31	1,27	3,73	4,15	7,33	0,16	0,87	3,01	1,67
Rhodofix	-H ₂ O ₂	J2	3,68	0,09	0,44	1,68	2,49	0,38	0,39	-1,04	0,98	2,03
		J3	6,80	-0,10	0,51	2,97	3,04	4,50	-0,09	-1,54	2,42	-0,13
	+H ₂ O ₂	J2	4,84	0,15	0,90	-0,18	2,16	2,19	0,19	-0,60	2,68	1,42
		J3	5,52	-0,26	1,11	2,66	1,12	4,09	0,40	0,20	4,22	0,89

Régalis	-H ₂ O ₂	J2	2,92	0,63	0,39	3,00	2,14	1,84	-0,59	-0,14	0,93	1,52
		J2	2,94	0,63	-0,46	0,30	1,43	0,52	-0,15	-0,10	1,81	1,56
		J3	1,50	0,82	0,19	1,63	3,43	-0,99	0,20	-0,66	0,66	-0,44
		J3	5,21	0,78	-0,07	2,72	1,49	1,08	0,25	-0,38	1,52	-0,17
	+H ₂ O ₂	J2	4,60	-0,54	0,17	3,65	1,40	-0,35	-1,07	-1,78	1,27	0,68
		J2	2,65	0,68	-0,72	-1,86	0,76	2,12	0,44	-0,64	2,81	0,91
		J3	2,10	-0,31	0,58	0,44	2,50	-0,96	0,10	-0,27	0,85	-1,09
		J3	1,28	-0,04	0,51	1,12	0,01	-0,02	0,89	-3,59	3,40	0,66
PRM12	-H ₂ O ₂	J2	0,56	0,67	0,78	0,29	0,34	-1,70	-0,39	-0,34	0,93	2,56
		J3	3,25	0,94	1,05	-0,90	-0,13	4,08	1,72	0,40	2,23	0,59
	+H ₂ O ₂	J2	3,59	0,36	0,30	1,47	-0,50	-0,94	-0,24	-0,22	3,56	2,74
		J3	2,52	0,00	1,24	4,88	-0,32	1,27	0,13	1,03	4,56	2,32
MeJA	-H ₂ O ₂	J2	0,66	1,52	0,05	0,98	1,91	1,25	1,60	1,25	1,92	3,82
		J3	3,86	0,01	1,14	3,87	1,22	0,85	1,45	0,63	1,96	1,22
	+H ₂ O ₂	J2	2,84	0,70	0,48	-2,02	-0,17	-0,06	1,51	0,73	3,48	2,54
		J3	4,29	0,35	1,48	2,16	0,98	3,46	1,99	1,61	2,28	1,80
Deshidratación		J2	-0,03	-0,89	0,23	-1,95	-0,07	-1,80	1,19	0,30	0,32	-1,87
		J4	0,00	-0,87	0,00	0,00	0,44	-2,58	1,07	0,00	0,71	0,00
		J7	1,54	-0,48	-0,53	2,56	0,13	0,63	1,85	-0,46	0,03	-1,23
		J10	2,44	-0,43	0,12	4,46	0,23	-0,39	2,06	0,04	1,74	0,91
PEG		J1	0,00	0,59	0,00	0,00	0,24	-1,23	1,51	0,00	-1,96	0,00
		J2	-1,33	0,72	0,24	2,18	0,46	0,70	2,48	1,06	0,69	0,02
		J2	-1,07	-0,52	0,38	-1,23	-0,92	-0,10	2,19	-0,46	-0,56	-1,82
		J3	-3,29	-0,31	-0,89	-0,98	0,96	3,41	0,41	-1,00	0,51	-0,36
		J4	0,81	0,86	0,43	2,37	-1,62	-1,24	1,36	-1,43	-0,33	0,63
		J7	0,00	0,06	0,86	2,38	-0,54	-2,30	1,96	-0,19	-0,36	0,18
		J10	-2,50	0,58	-0,08	0,56	-2,40	-1,11	1,00	-1,66	1,16	-0,07
Paraquat		J1	0,00	0,04	0,00	0,00	0,83	4,01	-0,58	0,00	-1,33	0,00
		J2	4,26	0,27	0,42	2,17	2,89	6,37	-0,54	-0,81	0,02	0,21
		J3	-0,53	-0,51	0,01	-2,82	2,28	2,76	-2,37	-2,46	0,41	-0,11
H ₂ O ₂		J2	1,07	-1,64	1,67	-0,44	1,42	-0,04	0,18	1,09	0,89	1,44
		J2	1,06	0,29	0,27	-1,62	-0,36	-0,12	-0,45	-0,27	1,36	1,53
		J3	-0,26	-0,72	-0,10	0,71	0,19	-2,26	0,16	-0,56	0,30	-0,26
		J3	1,88	-0,54	0,93	1,65	2,08	4,02	0,42	0,43	0,84	0,41
<i>E. amylovora</i>		6h	2,76	1,95	1,31	-1,27	1,36	6,02	-4,60	-3,83	1,66	5,00
		6h	3,64	1,63	2,92	-0,60	2,03	8,29	-4,63	-0,19	1,37	6,02
		24h	-0,79	1,81	0,09	-3,72	1,25	2,13	-3,50	-2,34	1,31	1,74
		24h	1,12	2,46	-0,42	-5,98	0,91	2,51	-2,57	-5,31	1,11	0,97

Ensayo 2 - Validación de la pertinencia de los genes seleccionados a partir de 10 SDN

Protocolo:

5

Los productos ensayados se enumeran en la tabla 7. Se trata de 10 candidatos SDN, así como un antibiótico (la Plantomicina).

Tabla 7

10

Productos ensayados	Materia activa	Concentración ensayada *	Observaciones
Aliette (BayerCropScience)	Fosetil-Al	6 g/l	Fungicida, SDN
Amid-Thin (Nufarm)	1-Naftalenoacetamida	0,6 g/l	Aclarador análogo a la auxina
Bion (Syngenta)	Acibenzolar-S-metilo	0,4 g/l	Análogo SA, SDN
Iodus (Goëmar)	Laminarina	7,5 ml/l	SDN
Maxcel (Valent Biosciences)	6-benciladenina	7,5 ml/l	Aclarador análogo a la citoquinina
PRM12 (BayerCropScience)	Etefón	3 ml/l	Aclarador precursor de etileno
Régalis (BASF)	Prohexadiona-Ca	2,5 g/l	Regulador de crecimiento análogo ácido 2-oxoglutarico
Rhodofix (Nufarm)	∞-Naftil ácido acético	1,5 g/l	Aclarador análogo a la auxina
Stifénia (S.O.F.T.)	Extracto de semillas de fénugrec	10 g/l	SDN
V-Plaask (Plaaskem)	Derivados SA + fertilizador	10 ml/l	Fertilizador y SDN
Plantomicina	Estreptomycina	0,56 g/l	Antibiótico

* Concentración en producto formulado

* Para el análisis de defensas

5 Los ensayos se llevan a cabo en condiciones semicontroladas en invernadero (23°C día/17°C noche, iluminación natural, completamente neón), sobre plántulas de manzano (procedente de semillas de la variedad Golden Delicious), en crecimiento activo, en las fases de 3 a 6 hojas.

10 Las plantas son pulverizadas hasta el rechazo con los productos candidatos o con agua (control negativo) a D0, con pulverizador de aire comprimido.

15 La mitad de estas plantas se pulveriza con peróxido de hidrógeno (dilución a la 200ª de una solución al 30%) con pulverizador manual a D1 (D0 + 1 día) para simular un ataque de *Erwinia amylovora*, agente del fuego bacteriano (esto permite localizar un efecto potencializador de las defensas frente al estimulador directo, para los productos ensayados).

20 Unas extracciones de discos foliares (10 discos de 0,6 cm de diámetro sobre 5 hojas F1 agrupadas/extracción) se efectúan el D0 (plántulas no tratadas = calibrador), después el D1 (antes del tratamiento con peróxido de hidrógeno), y finalmente el día D2 (D0 + 2 días) y D3 (D0 + 3 días) sobre los lotes, o no, con peróxido de hidrógeno.

Los discos foliares son inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C hasta la extracción de los ARN. Estos últimos son retrotranscritos en ADNc y los niveles de expresión de genes de defensa se siguen por qPCR (SYBR Green) con la ayuda de la herramienta según la invención.

25 Se han realizado tres ensayos biológicos para el conjunto de los productos.

30 Los niveles de expresión relativa son calculados con el método de $\Delta\Delta Ct$: se trata de expresiones relativas con respecto al calibrador (D0) o con respecto a los controles agua en cada tiempo de extracciones, normalizadas por la media geométrica de las expresiones relativas de 3 genes de referencia (TuA, actina, GAPDH). Estas expresiones relativas son transformadas en $\log_2$ para dar el mismo peso a las inducciones y a las represiones de genes.

* Para el análisis del poder de protección

35 Estos mismos productos se ensayaron por su poder de protección frente al fuego bacteriano de la manera siguiente.

Los ensayos se realizan sobre el mismo tipo de material vegetal y en unas condiciones de invernadero idénticas a las anteriores.

40 Los productos son pulverizados con el mismo pulverizador que anteriormente, 4 días o 4 horas antes de la inoculación artificial por *E. amylovora* (parcelas de 3x10 plántulas por producto y por tiempo de tratamiento-inoculación).

45 El día de la inoculación, la hoja más joven desarrollada (F1) de cada plántula (que ya se haya tratado 4 días antes por los productos, o que esté a punto de recibir un tratamiento denominado "-4h") se daña con la ayuda de un escalpelo (2 cortes paralelos en el 1/3 inferior de la hoja, y perpendiculares a la nervadura principal).

Se realizan entonces los tratamientos "-4h".

50 Cuatro horas después del tratamiento, una suspensión bacteriana de la cepa CFBP1430 de *E. amylovora*, preparada en agua estéril a 10^8 cfu/ml, se inocula por pulverización (con pulverizador a presión) sobre el conjunto de las plantas tratadas 4 días o 4 horas antes, y dañadas 4 horas antes.

55 La codificación de los síntomas, es decir la presencia de una necrosis que ha evolucionado sobre el tallo a partir de la hoja dañada, se realiza 3 semanas después de la inoculación. El porcentaje de plantas infectadas se calcula en cada parcela de 10 plantas y se refiere a la media de los porcentajes de infección obtenidos para las 3 parcelas control "agua" del mismo ensayo (infección relativa). Las distribuciones de los porcentajes de infección relativa obtenidos (intra e inter-experimentos) se representan por unos diagramas de cajas de Tuckey: la mediana se representa mediante la línea ancha negra en el centro de la caja y la media por el cuadrado; los puntos representan los intervalos de confianza de la mediana ($P=0,05$).

60 Se han realizado por lo menos dos ensayos independientes sobre el conjunto de los productos.

Resultados:

** Análisis de las defensas*

5 Los resultados de expresión media de los 28 genes diana están detallados en las tablas 8 y 9 siguientes; estos resultados están distribuidos en varias tablas, únicamente en aras de la presentación.

10 Los resultados de expresión de los genes procedentes de la herramienta según la invención (tabla 8 y 9) revelan 4 productos (Bion, Iodus, Régalis, Rhodofix) capaces de activar unas defensas de manera repetible sobre las 3 repeticiones biológicas independientes.

Las inducciones se refieren a un juego bastante próximo de genes en las hojas de manzano con, no obstante, algunas diferencias.

15 a) Bion es el producto que activa más genes, de manera más intensa (algunos genes son regularmente expresados 2^{10} veces más en los tejidos tratados con Bion que en los tejidos control) y de manera muy reproducible. Los genes de la vía SA son particularmente inducidos, y esta fuerte inducción está correlacionada con una represión de los genes de la vía JA, lo que es coherente con el antagonismo vía SA/vía JA descrito en la bibliografía.

20 b) Iodus, Régalis y Rhodofix activan, de manera significativa, sólo una parte de los genes inducidos por el Bion, o de manera menos constante. Por ejemplo, PR1, PR5 o PPO son 3 genes fuertemente activados por el Bion y, nada o poco por estos 3 productos.

25 c) Régalis muestra un efecto potencializador ya que las inducciones de genes se manifiestan sobre todo después del tratamiento con peróxido de hidrógeno (particularmente visible para el gen PECT).

30 d) los 3 otros productos que reivindican una acción SDN, a saber Aliette, Stifenía y V-Plaask, así como los 3 otros aclaradores, a saber Amid Thin, Maxcel y PRM12, o también el producto biocida Plantomicina, no provocan ninguna inducción reproducible y significativa.

** Análisis de la protección*

35 Entre los 11 productos ensayados, sólo tres manifiestan una eficacia de protección frente al fuego bacteriano cuando son pulverizados 4 días antes de la inoculación (condiciones para revelar un efecto estimulador): se trata del Bion, de Régalis y de Rhodofix, que reducen significativamente los porcentajes de infección de las plántulas (figura 1A).

40 Los productos que no inducen ninguno de los genes de defensa presentes en la herramienta, así como Iodus, que es capaz de inducir algunas defensas, no tienen eficacia de protección cuando se aplican 4 días antes de la inoculación.

Pulverizados algunas horas antes de la inoculación, Bion conserva una eficacia muy significativa; y Régalis presenta siempre una eficacia que sigue siendo asimismo significativa, a pesar de ser menos elevada (figura 1B).

45 Estas eficacias no alcanzan, sin embargo, la obtenida con la Plantomicina, biocida frente a *E. amylovora*.

Ningún otro producto disminuye, de manera significativa y reproducible, los porcentajes de infección de las plántulas.

** Conclusión*

50 A la vista de estos resultados, la herramienta según la invención permite eliminar la mayoría de los productos candidatos SDN que se muestran sin potencial de protección de las plántulas de manzano frente al fuego bacteriano, es decir Aliette, Amid Thin, Maxcel, PRM12, Stifenía, V-Plaask.

55 Entre los 4 productos retenidos por el cribado (Bion, Iodus, Régalis, Rhodofix), sólo Iodus no muestra finalmente ninguna eficacia de protección sobre las plántulas frente al fuego bacteriano.

60 La herramienta según la invención es por lo tanto útil para seleccionar los productos que tienen un potencial de protección (por lo menos frente al fuego bacteriano), y que merecen ser considerados para experimentación.

Tabla 8

Tratamiento	Plazo	PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HMGR	FPPS
Aliette	D1	-0,97	0,16	0,31	0,50	-0,28	0,10	2,13	0,37	-0,09	-0,01	-1,01	2,64	0,18	-0,40
	D2	-2,12	-2,17	0,92	-2,16	0,87	-0,20	0,46	-0,25	0,21	-0,03	0,22	-1,07	0,63	0,12
	D3	-0,55	0,49	0,48	0,26	-0,02	-1,27	-0,41	-1,17	-1,32	-1,55	-0,92	1,00	0,41	-0,18
	D2 + H ₂ O ₂	-0,68	1,05	3,91	-0,94	3,17	0,81	0,00	-0,95	-0,75	-0,70	-0,43	-0,09	0,54	0,00
	D3 + H ₂ O ₂	0,04	3,21	0,70	1,30	0,24	-0,01	0,53	-1,26	-1,58	-1,36	-1,06	1,64	0,44	-0,10
Amid Thin	D1	0,81	0,80	0,86	-0,57	0,39	1,50	-0,39	0,09	0,23	0,23	0,45	1,05	0,52	-0,39
	D2	-0,13	-0,73	0,65	-0,81	0,40	-0,32	0,52	0,06	0,74	0,54	0,53	-0,45	-0,05	0,02
	D3	-0,58	0,44	-0,37	0,21	-0,15	0,33	0,04	-0,23	-0,05	-0,56	-0,23	0,95	0,50	0,59
	D2 + H ₂ O ₂	0,37	2,33	3,22	-0,07	2,39	1,78	1,66	-0,16	-0,39	-0,19	-0,08	0,38	-0,17	0,45
	D3 + H ₂ O ₂	0,16	2,30	1,21	0,49	1,06	1,04	0,01	-1,17	-1,52	-1,73	-0,64	0,10	0,42	0,43
Bion	D1	1,74	6,30	5,80	3,73	2,51	1,06	-0,62	-0,17	-1,79	-1,64	-1,51	1,19	2,18	0,93
	D2	3,47	8,78	9,62	4,12	4,82	3,99	-0,89	2,22	0,97	0,78	1,10	3,65	3,31	1,74
	D3	6,18	11,20	9,96	4,70	5,29	7,61	4,24	1,11	0,09	0,26	0,30	5,55	1,64	1,02
	D2 + H ₂ O ₂	3,58	9,23	9,75	4,07	5,72	4,19	1,06	2,06	-0,17	-0,16	0,04	4,74	3,84	1,42
	D3 + H ₂ O ₂	6,07	11,05	8,99	4,46	4,97	6,87	2,40	0,78	0,53	0,04	0,20	4,32	2,23	0,75
Iodius	D1	1,67	6,04	6,91	1,24	3,37	4,09	1,90	0,50	-1,37	-1,03	-0,62	2,55	2,20	1,55
	D2	4,53	4,74	6,88	3,15	5,46	6,92	1,75	1,13	1,04	0,14	1,61	1,81	2,76	-0,02
	D3	3,30	3,22	4,64	1,56	2,43	1,26	0,08	-2,39	0,07	-0,42	-0,03	2,48	0,48	-0,25
	D2 + H ₂ O ₂	3,93	4,28	6,98	3,35	5,28	6,86	1,51	0,11	0,86	-0,63	1,10	0,89	2,71	0,05
	D3 + H ₂ O ₂	3,54	3,31	4,74	2,02	2,65	1,76	0,44	0,69	0,53	-0,20	0,54	2,39	0,75	-0,19
Maxcel	D1	0,45	-0,87	0,99	-0,20	0,10	0,77	-0,01	-0,01	0,20	-0,17	0,59	0,26	0,11	-0,59
	D2	-0,20	-1,11	0,18	-0,21	0,34	1,03	0,26	-0,31	0,65	0,07	0,55	-1,06	0,17	-0,06
	D3	0,75	-0,27	-0,01	0,08	-0,71	-2,12	1,00	-0,47	-1,14	-0,75	-0,21	0,61	0,04	0,43
	D2 + H ₂ O ₂	0,77	1,23	2,92	-0,46	2,81	0,88	0,32	-0,29	0,44	-0,50	0,59	-1,08	0,05	-0,03
	D3 + H ₂ O ₂	0,64	2,02	0,30	0,89	1,15	-0,49	-0,14	-0,42	-0,85	-0,77	-0,10	0,09	0,67	0,47
PRM12	D1	-0,79	0,01	2,58	-0,61	0,92	1,82	-0,97	1,06	0,92	0,37	1,13	0,62	0,98	-0,70
	D2	0,00	-0,31	0,66	-1,59	0,74	-1,04	-0,64	-0,44	0,32	-0,04	0,00	-0,22	0,36	-0,10
	D3	-0,49	0,10	0,11	0,20	-0,76	-1,25	1,16	-0,60	-0,91	-0,80	-0,52	1,15	-0,09	-0,09
	D2 + H ₂ O ₂	1,17	2,72	2,68	-0,41	2,77	1,47	1,75	-0,01	0,86	0,33	0,92	1,03	0,49	0,33
	D3 + H ₂ O ₂	-0,35	2,21	0,64	0,49	0,68	-1,21	0,17	-1,18	-1,36	-1,48	-0,70	0,15	0,19	-0,14
Regalis	D1	-0,24	0,79	3,93	-0,05	1,52	1,62	1,27	0,31	1,11	0,78	0,47	3,48	0,66	0,16
	D2	0,28	2,27	4,29	1,65	2,45	1,75	1,43	0,01	1,77	0,82	1,02	0,32	0,20	0,41
	D3	0,86	4,69	3,25	1,13	2,96	1,70	-0,04	0,63	1,54	0,97	1,04	0,38	0,64	0,17
	D2 + H ₂ O ₂	1,19	5,46	7,22	2,55	4,21	4,20	2,33	0,69	1,43	0,84	1,23	2,70	1,44	0,47
	D3 + H ₂ O ₂	2,87	6,25	6,17	2,94	4,20	3,20	1,13	1,29	1,52	1,25	1,78	2,35	1,08	0,45
Rhodofix	D1	1,46	4,99	6,65	0,83	3,69	6,53	0,88	0,39	0,00	0,15	0,64	2,77	1,89	0,76
	D2	1,27	6,82	7,40	3,26	4,33	4,18	-0,26	1,21	1,44	1,51	1,03	0,35	1,70	0,56
	D3	0,34	4,00	2,56	1,51	0,57	0,42	0,68	0,09	-0,17	-0,11	0,05	-0,12	-0,23	-0,08
	D2 + H ₂ O ₂	0,37	6,46	6,92	2,61	4,04	4,83	-0,44	-0,01	-0,10	0,06	0,01	0,48	1,25	0,36

Tratamiento	Plazo	PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HMGR	FPPS
Stifenia	D3 + H ₂ O ₂	2,19	4,95	4,82	2,02	2,71	1,34	0,06	-0,01	-0,24	-0,45	0,82	0,45	1,45	0,62
	D1	-0,80	0,14	-0,99	-0,46	-0,54	-0,75	-1,84	-1,12	-1,13	-1,00	-1,59	-0,82	-0,40	-0,25
	D2	0,72	1,28	1,56	3,09	2,33	1,12	1,19	0,31	0,88	0,68	0,63	-0,08	0,05	0,12
	D3	0,61	0,24	0,47	0,11	1,11	1,84	1,19	0,39	0,30	0,64	1,14	-0,50	0,57	1,29
	D2 + H ₂ O ₂	1,32	1,72	4,01	2,55	5,59	2,16	0,97	0,53	0,71	0,03	0,58	0,15	0,99	-0,13
Plantomyc.	D3 + H ₂ O ₂	1,31	-0,02	0,00	-0,07	1,19	0,11	-0,26	-0,70	-0,13	-0,39	0,23	0,81	0,58	0,22
	D1	1,23	1,05	1,51	-0,19	0,21	0,35	0,43	-0,48	-1,42	-0,99	-1,04	1,91	0,02	0,01
	D2	-1,62	-1,16	-0,33	-0,45	0,03	0,18	-0,94	-1,14	-0,79	-1,28	-1,50	-0,61	0,16	-0,50
	D3	1,39	2,59	1,35	1,12	0,27	0,14	1,93	-0,17	-1,00	-0,25	-0,96	1,13	-0,27	0,07
	D2 + H ₂ O ₂	1,54	2,96	4,03	0,07	3,00	1,80	0,37	-0,28	-0,07	0,07	0,04	1,38	0,89	0,09
Vplaask	D3 + H ₂ O ₂	2,03	3,31	2,19	0,60	1,14	-0,06	0,58	-0,88	-0,63	-0,44	-0,68	1,75	0,30	-0,34
	D1	-0,66	-0,20	0,25	1,60	0,17	-0,05	0,83	0,24	0,52	0,35	-0,20	0,88	-1,60	-0,43
	D2	0,76	-0,15	-0,98	1,53	2,50	2,37	1,02	-3,41	-0,25	-1,44	-0,33	-0,78	0,77	-2,23
	D3	0,40	-0,45	0,38	0,57	0,16	-1,44	0,23	-0,20	-0,61	-1,29	-0,78	0,35	0,28	0,13
	D2 + H ₂ O ₂	0,37	1,11	1,39	1,53	2,83	2,22	2,54	-1,33	0,27	-1,03	0,64	0,79	0,84	0,47
H ₂ O ₂	D3 + H ₂ O ₂	1,43	0,48	0,24	1,25	0,30	-1,88	1,05	-0,79	-1,39	-1,61	-1,00	1,26	0,34	0,57
	D2 + H ₂ O ₂	0,85	3,69	3,89	0,91	2,12	1,32	-0,26	-0,56	-0,63	-0,80	-0,65	1,20	1,05	0,06
	D3 + H ₂ O ₂	1,41	4,05	2,59	1,73	1,73	3,29	1,57	-0,57	-0,49	-0,75	-0,36	0,71	0,14	0,08

Tabla 9

Tratamiento	Plazo	PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HMGR	FPPS
Aliette	D3 + H ₂ O ₂	1,28	0,24	0,12	0,42	2,08	0,08	0,25	0,24	-0,21	-0,30	0,29	0,15	-0,09	0,69
	D1	0,06	0,17	-0,40	0,51	0,91	0,31	-0,14	1,21	0,18	0,02	0,45	0,11	0,57	0,71
	D2	-0,54	0,16	-0,42	0,46	0,01	0,37	0,09	0,11	1,03	-0,33	0,38	-0,09	0,44	0,59
	D3	-0,30	-0,14	-0,14	0,54	0,37	0,05	0,18	0,37	0,32	0,38	0,19	0,13	0,36	0,13
	D2 + H ₂ O ₂	0,20	0,51	0,13	0,88	1,16	0,41	0,71	1,62	1,74	1,53	-0,09	0,42	0,89	0,35
Amid Thin	D3 + H ₂ O ₂	0,96	-0,39	-0,47	0,44	0,77	-0,15	0,33	0,03	0,27	-0,45	-0,40	-0,28	0,04	-0,27
	D1	4,20	1,74	-0,06	2,35	1,66	0,51	-0,04	0,17	3,21	2,30	-0,67	-1,10	0,89	0,52
	D2	3,26	5,50	0,42	2,08	3,27	0,14	-0,17	1,03	4,14	5,54	-0,36	-0,82	1,26	1,02
	D3	2,54	7,15	0,62	1,86	3,47	0,38	0,49	2,26	4,09	4,99	-1,25	-0,84	1,11	0,30
	D2 + H ₂ O ₂	2,36	6,70	0,49	1,99	3,67	0,25	-0,18	1,10	4,65	5,61	-1,52	-2,01	1,12	0,64
Bion	D3 + H ₂ O ₂	0,96	-0,39	-0,47	0,44	0,77	-0,15	0,33	0,03	0,27	-0,45	-0,40	-0,28	0,04	-0,27
	D1	4,20	1,74	-0,06	2,35	1,66	0,51	-0,04	0,17	3,21	2,30	-0,67	-1,10	0,89	0,52
	D2	3,26	5,50	0,42	2,08	3,27	0,14	-0,17	1,03	4,14	5,54	-0,36	-0,82	1,26	1,02
	D3	2,54	7,15	0,62	1,86	3,47	0,38	0,49	2,26	4,09	4,99	-1,25	-0,84	1,11	0,30
	D2 + H ₂ O ₂	2,36	6,70	0,49	1,99	3,67	0,25	-0,18	1,10	4,65	5,61	-1,52	-2,01	1,12	0,64
Iodus	D3 + H ₂ O ₂	2,02	6,54	0,60	1,46	4,19	-0,02	0,16	2,07	4,22	5,04	-1,34	-1,06	0,98	-0,06
	D1	2,58	3,78	0,13	1,75	1,19	-0,43	-0,15	0,16	0,74	1,90	-0,34	-0,05	0,91	0,03
	D2	2,45	4,08	0,36	2,07	0,94	0,65	0,50	4,70	3,14	2,68	0,68	0,49	2,52	1,14
	D3	2,23	2,33	0,66	0,98	2,57	0,84	0,78	1,97	2,63	2,16	0,33	0,24	2,94	0,82
	D2 + H ₂ O ₂	3,05	3,40	-0,08	1,90	1,46	-0,19	0,71	4,55	1,33	2,11	0,34	1,30	2,10	0,87

Tratamiento	Plazo	PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HMGR	FPPS
Maxcel	D3 + H ₂ O ₂	1,32	3,15	-0,32	1,91	2,73	0,12	0,42	1,21	2,05	2,33	-0,25	0,37	1,23	0,11
	D1	-0,73	-0,17	-0,17	-0,23	-0,07	-0,46	-0,39	-0,23	0,11	-0,51	-0,20	-0,42	-0,19	0,10
	D2	-0,83	0,66	-0,60	0,56	-0,39	0,45	0,45	0,14	1,12	-0,11	0,29	0,00	0,52	0,93
	D3	0,15	-0,35	0,07	-0,04	0,01	-0,01	0,50	-0,19	0,22	-0,64	0,02	0,25	-0,02	-0,23
	D2 + H ₂ O ₂	-0,26	1,01	-0,07	0,79	1,34	0,51	0,11	0,12	2,25	1,34	-0,01	-0,18	0,54	0,95
	D3 + H ₂ O ₂	0,18	0,17	0,13	0,52	1,45	-0,13	0,36	0,45	1,17	0,50	0,21	0,21	0,44	0,52
PRM12	D1	0,48	-0,03	-0,70	0,22	-0,12	0,24	-0,23	0,80	0,50	-0,21	0,06	-0,90	0,40	1,61
	D2	-1,41	0,27	-0,66	0,47	-0,19	0,39	0,59	0,78	0,94	-0,36	0,02	-0,50	0,63	1,41
	D3	-0,43	0,02	-0,06	0,55	0,34	-0,03	0,70	0,73	-0,09	0,07	-0,38	-0,10	0,35	-0,05
	D2 + H ₂ O ₂	0,42	1,71	0,39	0,86	1,42	0,39	0,65	2,22	0,81	1,83	-0,03	0,10	1,11	1,72
	D3 + H ₂ O ₂	-0,40	-0,28	-0,27	0,27	0,73	-0,24	0,15	0,19	0,08	0,25	0,13	0,03	0,18	0,03
	D1	1,83	0,89	-0,07	1,26	0,86	0,40	-0,01	-0,44	0,77	2,10	-0,07	-0,40	0,31	0,31
Regalis	D2	2,15	1,87	-0,06	1,79	1,80	0,68	0,14	0,73	1,60	0,42	0,03	-0,14	0,66	0,06
	D3	2,06	1,16	0,24	1,45	2,91	0,43	0,10	0,73	1,99	1,66	0,13	-0,03	0,53	-0,10
	D2 + H ₂ O ₂	3,72	3,19	-0,08	2,61	3,32	0,41	0,21	2,30	2,78	2,14	-0,08	-0,13	1,25	0,48
	D3 + H ₂ O ₂	2,81	2,81	0,41	2,12	4,25	0,75	0,41	2,58	2,46	3,33	0,24	0,02	1,21	0,62
	D1	3,09	0,90	-0,27	2,34	-0,11	-0,01	0,81	2,72	2,76	1,47	0,08	-0,69	2,01	0,91
	D2	3,18	2,97	-0,57	2,02	0,86	0,73	1,24	3,50	4,17	0,84	0,86	-0,31	1,79	1,59
Rhodofix	D3	1,51	1,21	0,08	1,01	1,74	0,50	1,07	3,01	0,91	-0,58	0,62	0,39	0,79	0,81
	D2 + H ₂ O ₂	3,16	2,41	-0,55	1,77	1,14	0,21	0,73	2,89	3,61	0,45	0,09	-0,87	1,32	0,83
	D3 + H ₂ O ₂	1,32	2,97	-0,08	1,11	0,80	0,18	0,67	2,21	2,30	0,87	0,08	-0,57	0,98	-0,17
	D1	0,15	-0,85	-0,64	-0,32	-0,44	-0,42	-0,71	-1,08	-0,32	0,33	-0,48	-0,07	-0,12	-0,42
	D2	0,62	0,95	0,20	0,78	0,18	0,15	0,48	1,82	1,20	0,69	0,66	0,54	1,91	0,69
	D3	0,01	0,71	0,49	7,33	0,76	0,05	0,68	2,06	2,83	0,43	-0,16	1,47	5,54	0,88
Stifenía	D2 + H ₂ O ₂	1,45	1,07	-0,71	0,84	0,65	0,48	0,31	3,30	1,94	1,14	-0,03	0,51	-0,33	1,06
	D3 + H ₂ O ₂	0,48	-0,29	0,08	7,24	0,89	0,05	0,40	1,93	2,78	0,65	-0,58	1,31	4,23	0,84
	D1	-0,03	-0,59	-0,02	-0,03	1,37	-0,09	-0,08	0,21	0,14	1,36	0,12	0,27	0,29	0,00
	D2	-1,10	-0,96	-0,68	-0,06	-0,72	-0,15	-0,07	-0,57	-0,02	-1,10	-0,24	-0,62	-0,15	0,20
	D3	0,53	0,65	0,39	-0,01	0,80	0,10	0,02	0,18	-0,14	1,00	-0,16	0,24	0,14	0,05
	D2 + H ₂ O ₂	0,28	1,46	-0,37	0,65	3,03	-0,04	-0,01	1,06	0,99	1,47	-0,01	-0,27	0,47	0,55
Plantomyc.	D3 + H ₂ O ₂	0,49	0,61	-0,17	0,25	2,60	0,05	-0,05	0,69	0,29	0,11	0,00	-0,12	0,21	0,36
	D1	-0,49	0,62	-0,06	-0,40	0,11	-0,55	-0,31	-0,40	-0,39	-0,53	-0,43	-0,12	0,42	-0,31
	D2	-0,42	-0,54	-0,18	1,32	0,32	0,58	0,54	3,05	0,81	1,01	0,03	0,38	1,60	1,12
	D3	0,26	0,49	-0,47	3,32	0,75	-0,02	0,74	-0,16	0,95	0,56	-0,21	0,46	1,95	0,36
	D2 + H ₂ O ₂	-0,44	0,66	-0,68	0,92	0,96	0,37	0,56	2,96	0,95	0,43	0,02	0,29	1,88	1,04
	D3 + H ₂ O ₂	0,23	0,25	-0,21	3,31	2,25	0,07	0,78	0,74	0,05	1,54	-0,04	0,85	2,89	0,75
H ₂ O ₂	D2 + H ₂ O ₂	1,07	2,28	-0,37	0,21	2,12	-0,32	-0,31	0,01	1,12	1,42	-0,39	-0,62	0,60	-0,20
	D3 + H ₂ O ₂	0,12	1,32	0,36	0,30	1,61	0,30	0,04	1,53	1,44	1,27	-0,03	0,09	0,37	0,33

Ensayo 3: Verificación de la fiabilidad de la herramienta sobre unas plantas sometidas a 3 condiciones de estrés: luminoso, térmico e hídrico

5 Protocolo:

**Estrés luminoso*

10 Unas plántulas de Golden Delicious (similares a las del ensayo 2) se desplazan (D0) del invernadero de cría hacia diversos invernaderos, cámaras climáticas o armarios climáticos, que poseen unas iluminaciones cuantitativa y cualitativamente diferentes (Tabla 10) con un fotoperiodo de 16h día/8h noche en caso de iluminación artificial y un termoperiodo de 23°C día/17°C noche.

15 Tabla 10 - Condiciones de iluminación ensayadas

Nº de condiciones	Lugar	Tipo de iluminación	Control de la temperatura	Humedad
Condición 1	Invernadero	Natural + neón	De apertura	Ambiente
Condición 2	Cámara	HPS + MH	Climatizador	Controlada
Condición 3	Cámara	MH	Climatizador	Ambiente
Condición 4	Cámara	HPIT	Climatizador	Controlada
Condición 5	Cámara	Neón	Climatizador	Controlada
Condición 6	Invernadero	Natural + HPS	Ventilador extractor	Ambiente
Condición 7	Invernadero	Natural + HPS	Ventilador extractor	Ambiente
Condición 8	Invernadero	Natural + neón	Ventilador extractor + "cooling"	Ambiente
Condición 9	Armario	Neón	Climatizador	Ambiente
Condición 10	Armario	Neón	Climatizador	Controlada

Sufren allí una aclimatación de 24h y después se pulverizan hasta el rechazo con un pulverizador manual con Bion (0,4 g/l) o agua (D1).

20 Se efectúan unas extracciones (metodología idéntica a la del ensayo 2) el D0 antes del desplazamiento (3 repeticiones de 10 discos), después el D1 antes del tratamiento (3 repeticiones de 10 discos) después los D3 y D4 sobre los lotes tratados (1 repetición de 10 discos/tratamiento/condición).

25 Las muestras son extraídas y analizadas con la ayuda de la herramienta según la invención, de manera idéntica a la del ensayo 2. Este experimento se realizó una vez.

** Estrés térmico*

30 Se desplazan (D0) unas plántulas de Golden Delicious (similares a las del ensayo 2) desde el invernadero de cría hacia 2 armarios climáticos regulados con el mismo régimen de fotoperiodo (16h día/8h noche) pero con dos regímenes diferentes de termoperiodo (23°C día/17°C noche o 35°C día/17°C noche).

35 Sufren allí una aclimatación de 24h y después se pulverizan hasta el rechazo con un pulverizador manual con Bion (0,4 g/l) o agua (D1).

Se efectúan unas extracciones (metodología idéntica a la del ensayo 2) el D1 antes del tratamiento y después el D4 sobre los lotes tratados (1 repetición de 10 discos/tratamiento/condición de temperatura/fecha de extracción).

40 Las muestras son extraídas y analizadas con la ayuda de la herramienta según la invención, de manera idéntica a la del ensayo 2. Se realizaron dos repeticiones biológicas independientes.

** Estrés hídrico*

45 Se disponen en un invernadero de experimentación (D-1) y dispuestos en 3 lotes, unas plántulas de Golden Delicious (similares a las del ensayo 2).

Un lote sufre inmediatamente dos riegos sucesivos con PEG6000 al 36% (inmersión, espera del resecado, y después nueva inmersión) (PEG el D-1).

50 Después de una aclimatación de 24h del conjunto de las plántulas, se trata un 2º lote también con PEG6000 de manera idéntica a la anterior (PEG el D0).

El conjunto de los lotes se pulveriza después hasta el rechazo con un pulverizador manual con una mitad de Bion (0,4 g/l) y la otra mitad agua.

Se efectúan unas extracciones (metodología idéntica a la del ensayo 2) el D0 sobre el lote no tratado con PEG y antes del tratamiento Bion o agua, después los D2 y D3 sobre el conjunto de los lotes (1 repetición de 10 discos/tratamiento/condición hídrica/fecha de extracción).

Las muestras son extraídas y analizadas con la ayuda de la herramienta según la invención, de manera idéntica a la del ensayo 2. Este experimento se realizó una vez.

Resultados:

** Estrés luminoso*

Los resultados de expresión de los 28 genes diana se detallan a continuación en las tablas 11 y 12; estos resultados están repartidos en varias tablas, únicamente en aras de la presentación.

En estas tablas, las líneas corresponden respectivamente:

- "no tratada" = modulación observada 24h (D1) después del desplazamiento del invernadero de cría;
- "agua" y "Bion" = modulación observada 48 y 72 horas después del tratamiento, es decir 3 y 4 días después del desplazamiento del invernadero de cría (D3 y D4), mediada, en las hojas de plántulas pulverizadas con Bion o con agua, respectivamente.

La observación de los perfiles de inducción de las plántulas después de 24h de aclimatación en las diferentes condiciones de iluminación (tablas 11 y 12) muestra una correlación entre la potencia (y espectro) de la iluminación complementaria e inducción de genes de la vía de los fenilpropanoides.

El análisis de los perfiles después del tratamiento de las plántulas con Bion, o con agua, revela que las condiciones de iluminación más estresantes no permiten demostrar un fuerte poder inductor del Bion en particular a nivel de las proteínas PR (Tabla 11), lo que no es el caso de las condiciones menos estresantes.

Algunos genes son, sin embargo, menos sensibles a las condiciones de iluminación que los que codifican ciertas proteínas PR o unas enzimas de la vía de los fenilpropanoides, y permiten demostrar el efecto estimulador del Bion en la mayoría de las condiciones: se trata de PR5, FAR y EDS1.

** Estrés térmico*

Los resultados medios de expresión de los 28 genes diana están detallados en las tablas 13 y 14; estos resultados están repartidos en varias tablas, únicamente en aras de la presentación.

Para estas tablas, la leyenda es la siguiente: T normales = 23°C día/17°C noche; T normales y después estresantes después del tratamiento = 23°C día/17°C noche durante 24h, después 35°C día/17°C noche; T estresantes = 35°C día/17°C noche; T estresantes y después normales después del tratamiento = 35°C día/17°C noche durante 24h después 23°C día/17°C noche.

Unas condiciones de estrés térmico (35°C) son capaces de activar fuertemente algunos genes de la herramienta según la invención, en particular varias proteínas PR, en las plántulas control (tratadas con agua) cuando el estrés se mantiene a lo largo del experimento (4 días), o aplicado justo después de la pulverización del agua (tablas 13 y 14).

Esta inducción está correlacionada con una fuerte represión de los genes de la vía de los fenilpropanoides (salvo PPO).

Estos efectos de inducción/represión son transitorios en cuanto se interrumpe el estrés, ya que no se vuelven a observar las plántulas control estresadas 24h y devueltas a condiciones "normales".

La inducción de ciertas proteínas PR provocada por el estrés térmico aplicado hasta la fecha de la extracción oculta las capacidades del Bion para inducir las proteínas PR (tabla 13).

Sin embargo, otros genes de la herramienta permiten revelar el efecto del Bion, incluso en estas condiciones estresantes, como débilmente inducidos por el estrés térmico en sí (CSL, POX, WRKY).

Por último, un estrés térmico transitorio aplicado algunas horas antes del tratamiento con Bion no interrumpe la demostración del efecto inductor de este producto.

** Estrés hídrico*

Los resultados de expresión de los 28 genes diana están detallados en las tablas 15 y 16; los resultados están repartidos en varias tablas, únicamente en aras de la presentación.

En las plántulas de manzano, el estrés hídrico tal como se ha aplicado (PEG) no induce en sí los genes de la herramienta (Tabla 15 y 16): no se observan claras diferencias entre los perfiles de expresión obtenidos en los 3 lotes de plantas, estresados o no, y pulverizadas con agua. Además, no parece perturbar el efecto inductor del Bion, que se revela en las 3 condiciones.

** Conclusión*

Estos experimentos demuestran el interés de estudiar varios grupos de genes de defensas, incluso varios genes dentro de cada grupo, para revelar el efecto estimulador de un SDN candidato.

En efecto, unas condiciones medioambientales poco estresantes (fuerte iluminación y temperatura elevada) pueden inducir por sí mismas ciertos genes de defensa presentes en la herramienta según la invención y ocultar los efectos de los SDN.

Para una utilización óptima de la herramienta en un objetivo de cribado de productos candidatos, se aconseja sin embargo realizar los experimentos en condiciones de iluminación artificial moderada y en condiciones térmicas las más controladas posibles. Un estrés hídrico, en el límite de lo razonable por supuesto, no debería perturbar la utilización de la herramienta.

Tabla 11

		PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HMGR	FPPS
C1=Invernadero 1 de cría	No tratado	0,17	-0,11	-0,53	-0,59	0,28	-0,13	-0,49	0,04	0,07	-0,11	-0,17	-0,58	0,27	-0,12
	No tratado	-0,62	-0,18	-1,14	-1,98	1,73	-1,02	-0,96	6,72	6,96	6,58	6,30	-1,08	-1,22	-2,25
C2=Cámara climática 1 (iluminación HPS + MH)	Agua	-1,00	-0,23	-2,57	1,46	2,22	-1,56	0,03	5,84	5,52	5,44	4,28	0,53	0,02	-1,91
	Bion	0,37	0,99	-0,53	5,11	3,70	-0,26	-0,13	5,90	5,78	5,42	4,33	0,18	0,92	-2,06
C3=Cámara climática 2 (iluminación MH)	No tratado	-0,20	0,40	-0,90	-0,32	2,30	-0,19	-0,24	5,48	5,27	5,18	4,75	0,11	-0,66	-0,96
	Agua	-0,44	3,52	-0,39	3,06	2,68	-1,02	-0,11	4,83	3,94	4,34	3,39	-0,59	0,19	0,06
C4=Cámara climática 3 (iluminación natural + HPIT)	Bion	0,38	1,95	-0,44	5,30	4,83	-1,07	-1,09	4,80	4,33	4,25	3,56	0,43	1,06	-0,99
	No tratado	-0,30	0,10	-1,32	-0,80	0,16	-0,71	-0,40	5,67	5,18	5,04	4,13	-0,65	-0,74	-1,87
C5=Cámara climática 4 (iluminación neón ACTIVA172)	Agua	-0,21	-0,95	-1,15	2,06	1,72	-0,92	0,34	3,05	3,73	3,56	2,31	0,14	-0,25	-0,05
	Bion	2,98	5,12	4,90	6,7	6,05	0,30	2,61	3,73	3,16	3,57	2,36	3,02	1,91	0,37
C6=Invernadero 2 (iluminación natural + HPS)	No tratado	-0,47	0,19	-3,56	-0,47	0,96	-0,97	-0,20	3,99	4,55	4,10	4,04	-0,88	-1,14	-1,39
	Agua	-0,66	-1,56	-1,39	2,19	1,12	-1,85	-0,02	3,88	4,87	4,37	3,25	0,22	-0,67	-1,23
C7=Invernadero 3 (iluminación natural + HPS)	Bion	-0,38	3,73	0,97	6,49	4,67	-0,62	1,83	4,54	5,28	4,91	3,81	-0,05	0,33	-1,27
	No tratado	0,46	0,161	-1,65	0,05	2,03	-0,50	0,31	5,20	5,25	5,13	4,63	-0,42	-0,66	-1,59
C8=Invernadero 4 (iluminación natural + neón)	Agua	0,33	-0,35	-0,87	0,60	2,93	-0,72	0,24	6,13	5,93	5,62	4,65	1,30	-0,15	-1,21
	Bion	3,23	7,90	6,36	6,13	6,24	1,70	-0,89	4,86	5,11	4,78	4,11	2,22	1,40	-1,16
C9= Armario 1 (iluminación neón)	No tratado	-0,05	0,23	-1,10	-0,62	1,63	-0,13	0,33	3,44	1,65	2,50	0,15	-0,65	-0,16	-0,59
	Agua	-0,42	-1,23	-2,61	1,36	1,25	-0,57	0,48	3,42	3,43	3,51	2,34	0,21	-0,58	-0,85
C10= Armario 2 (iluminación neón)	Bion	1,62	6,48	5,54	7,45	6,08	1,66	1,60	4,55	4,48	3,98	3,72	2,72	1,68	-0,05
	No tratado	0,23	0,50	-0,94	0,19	1,26	-0,30	0,55	0,89	0,03	0,22	-0,68	-0,01	-0,03	0,44
C10= Armario 2 (iluminación neón)	Agua	0,23	0,38	-0,49	2,31	2,28	0,04	0,29	1,37	1,11	1,28	-0,22	0,08	0,58	0,75
	Bion	2,58	8,28	8,08	7,30	7,92	5,60	1,82	3,44	1,61	1,84	0,88	3,93	3,00	1,60
C9= Armario 1 (iluminación neón)	No tratado	-1,55	-0,64	0,11	-0,55	1,34	0,24	0,14	2,66	3,14	3,04	3,40	-0,39	-0,04	-1,15
	Agua	0,64	1,16	1,38	1,73	3,19	1,24	1,75	2,79	3,26	2,88	3,56	0,81	1,10	-0,59
C10= Armario 2 (iluminación neón)	Bion	2,32	7,42	8,21	4,16	5,30	5,81	2,07	1,83	1,91	1,82	2,29	3,27	2,41	0,05
	No tratado	0,20	-0,41	-1,62	-0,72	0,72	2,85	0,03	2,38	3,27	2,78	3,62	-1,76	-0,50	-0,67
C10= Armario 2 (iluminación neón)	Agua	2,25	5,52	1,79	3,62	3,70	6,49	-0,26	0,22	1,07	0,60	2,03	-1,49	0,75	-0,17
	Bion	2,84	8,57	6,78	4,63	5,43	5,37	-0,16	1,87	2,48	2,19	3,17	1,84	2,24	-0,25

Tabla 12

		FAR	CSL	APOX	GST	POX	CAD	CaIS	PECT	EDS1	WRKY	LOX2	JAR	ACCO	EIN3
C1=Invernadero 1 de cría	No tratado	0,76	-0,27	0,18	-0,17	0,77	0,19	0,01	-0,18	-0,23	-0,22	0,07	-0,03	-0,05	0,03
	No tratado	-6,15	4,58	1,08	-2,55	0,80	0,39	-1,10	0,40	1,20	0,55	0,36	-0,02	-0,84	-0,58
C2= Cámara climática 1 (iluminación HPS + MH)	Agua	-3,36	2,96	0,54	-2,89	1,08	0,03	-1,19	-1,05	0,47	-0,06	-0,86	-1,28	-1,90	-0,81
	Bion	-0,35	2,94	0,26	-2,84	2,09	0,17	-1,05	-0,12	3,08	-0,50	-1,44	-1,40	-1,38	-0,24
C3= Cámara climática 2 (iluminación MH)	No tratado	-0,24	2,93	1,37	-1,31	1,30	0,58	-0,62	0,66	-0,35	-0,261	0,79	0,551	-0,17	0,65
	Agua	1,75	2,11	0,66	-2,02	1,30	0,20	-1,13	-0,64	1,32	0,76	-0,45	0,49	-0,67	0,30
C3= Cámara climática 2 (iluminación MH)	Bion	3,62	2,31	0,78	-1,77	1,92	0,22	-0,73	0,72	4,31	-0,12	0,06	0,46	-0,90	0,69

		FAR	CSL	APOX	GST	POX	CAD	CaS	PECT	EDS1	WRKY	LOX2	JAR	ACCO	EIN3
C4= Cámara climática 3 (iluminación natural + HPIT)	No tratado	-1,46	2,30	1,59	-2,20	0,58	0,03	-0,80	-0,51	-1,04	-0,12	0,39	-0,14	-1,19	0,20
	Agua	0,41	2,21	0,85	-0,62	0,02	0,42	-0,35	-0,81	0,03	-0,59	-0,50	-0,14	0,18	0,08
	Bion	2,77	3,62	0,88	-0,37	2,03	0,70	-0,38	1,36	4,31	3,88	-0,65	-0,18	0,78	1,00
C5= Cámara climática 4 (iluminación neón ACTIVA172)	No tratado	-1,06	2,44	1,11	-2,03	1,83	0,29	-0,91	-0,60	-1,63	-0,53	0,17	-0,05	-0,69	-0,72
	Agua	0,93	1,88	0,85	2,64	1,31	-0,07	-1,16	-1,74	0,25	-1,08	-0,70	-0,39	-0,54	0,59
	Bion	3,38	2,84	1,14	-2,67	2,93	0,21	-0,98	-0,38	3,73	1,17	-0,64	-0,10	-0,70	-0,06
C6=Invernadero 2 (iluminación natural + HPS)	No tratado	0,34	2,96	1,01	-2,08	1,99	0,54	-0,87	-0,43	0,19	1,471	0,65	0,271	-0,70	-0,51
	Agua	2,57	3,59	1,05	-2,46	2,45	0,33	0,82	-0,24	0,48	-0,21	0,68	0,14	-0,48	0,55
	Bion	5,30	4,54	0,91	-1,58	4,03	0,39	-1,12	1,60	4,35	4,24	0,37	-0,22	0,52	1,14
C7=Invernadero 3 (iluminación natural + HPS)	No tratado	-0,44	-0,06	0,75	-1,02	1,26	0,07	-0,38	-0,23	-0,10	0,91	0,86	0,49	-0,57	0,21
	Agua	1,78	1,04	0,88	2,07	1,54	0,04	-1,08	-1,02	0,36	0,29	-0,45	-0,31	-0,33	0,01
	Bion	5,67	4,22	1,42	-0,93	3,37	0,48	-0,54	1,25	4,44	1,78	0,11	0,55	0,31	0,96
C8=Invernadero 4 (iluminación natural + neón)	No tratado	1,20	-0,37	0,95	0,04	0,70	0,23	0,27	0,33	-0,54	1,27	0,65	0,80	0,38	-0,32
	Agua	0,38	1,52	0,45	-0,40	0,97	0,30	0,07	0,12	0,40	1,45	0,15	0,34	0,55	0,28
	Bion	4,83	5,99	0,90	1,52	5,50	0,63	0,33	2,42	5,40	5,02	-0,17	-0,13	2,06	2,01
C9= Armario 1 (iluminación neón)	No tratado	-0,27	0,97	0,25	-1,86	-0,78	0,00	-0,72	-0,05	0,85	1,20	0,07	-0,50	-0,79	0,15
	Agua	2,86	2,06	0,21	-1,14	2,36	0,22	-0,12	2,61	3,05	2,13	0,19	-0,66	-0,82	1,05
	Bion	5,22	3,67	0,77	0,07	3,36	0,03	-0,15	2,90	5,30	5,37	-0,08	-0,58	1,02	0,91
C10= Armario 2 (iluminación neón)	No tratado	0,14	1,45	0,12	-0,57	-0,55	0,00	-0,96	1,36	0,32	-0,20	0,10	0,11	-0,05	0,73
	Agua	3,59	0,52	0,13	-0,09	1,75	-0,02	-0,31	3,18	3,27	-1,10	-0,24	-0,26	-0,17	0,67
	Bion	5,00	2,53	0,32	0,43	4,22	0,36	-0,64	4,23	4,88	3,94	-0,16	-0,54	0,73	1,24

Tabla 13

		PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HMGR	FPPS
T normales	Agua	0,99	-1,03	-0,48	2,02	0,63	-1,46	0,77	-1,05	1,05	-1,03	-1,68	-0,4	0,91	-1,39
	Bion	3,79	6,22	7,77	4,21	3,67	1,89	-0,57	-2,16	-1,35	1,64	-1,77	-0,76	1,63	-1,12
	Agua	5,59	7,91	9,28	1,34	3,53	7,13	-0,01	-4,77	-4,96	-5,65	-4,77	0,13	1,36	0,77
T normales y después estresantes	Bion	9,82	11,2	12,9	4,34	6,38	7,86	0,66	-3,71	-4,7	5,86	-5,39	2,82	4,36	1,18
	Agua	7,02	7,46	9,57	2,04	4,78	4,79	4,62	-3,96	4,61	-5,04	-5,27	1,61	2,43	0,92
	Bion	9,55	11,3	14	3,71	7,96	9,23	4,65	-3,93	5,29	-6,17	-5,36	5,42	4,77	1,36
T° estresantes y después normales	Agua	2,95	1,1	0,87	2,64	2,19	-0,27	-0,07	1,19	0,5	-1,01	1,08	1,54	1,48	1,14
	Bion	6,46	8,67	9,55	4,9	5,36	4,57	0,12	1,95	-1,94	-2,48	-1,63	1,35	3,17	0,77

Tabla 14

		FAR	CSL	APOX	GST	POX	CAD	CaS	PECT	EDS1	WRKY	LOX2	JAR	ACCO	EIN3
T° normales	Agua	2,44	-0,24	-1,29	-1,05	-1,03	-0,25	-0,45	0,48	2,02	1,15	0,19	-1,04	-0,8	0,32
	Bion	3,34	0,91	-0,97	-0,33	1,96	0,11	-0,54	1,22	2,96	0,93	0,16	-0,82	-0,24	0,14
	Agua	1,16	0,82	-1,45	2,4	0,97	0,43	1,12	3,49	2,56	1,03	1,35	1,03	1,69	1,94
T° normales y después estresantes	Bion	0,45	4,65	-1,18	1,89	5,54	0,4	1,05	2,04	4,79	5,48	0,66	0,63	1,29	0,98
	Agua	1,16	1,26	-1,23	2,28	1,96	0,66	0,65	2,77	2,46	1,51	0,49	0,45	1,16	1,29

		FAR	CSL	APOX	GST	POX	CAD	CaIs	PECT	EDS1	WRKY	LOX2	JAR	ACCO	EIN3
T° estresantes y después normales	Bion	-0,47	6,17	-0,56	2,83	6	0,93	1,3	2,56	4,44	4,66	-0,64	0,83	1,52	1,23
	Agua	1,88	-0,13	-0,86	-0,4	0,79	0,03	-0,29	1,16	2,45	-0,58	0,39	0,72	0,61	0,82
	Bion	4	2,71	0,57	1,68	3,72	0,19	0,09	1,9	3,73	4,93	0,15	-0,59	1,27	0,89

Tabla 15

		PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HMGR	FPPS
Riego normal	Agua	-1,0	4,7	5,1	1,8	1,3	1,3	-0,3	1,3	1,8	1,8	0,7	-0,1	-0,1	0,2
	Bion	2,8	10,3	12,0	5,2	5,0	5,0	-0,4	1,3	1,1	1,1	0,9	5,1	2,4	1,0
PEG a D-1	Agua	0,1	1,5	5,7	1,8	1,6	3,5	0,5	0,9	1,5	1,7	1,1	0,2	0,2	-0,3
	Bion	7,2	10,8	11,0	6,2	4,6	7,3	0,0	1,3	1,4	1,6	1,4	2,7	1,9	0,5
PEG a D0	Agua	1,8	4,0	7,9	0,8	2,5	1,0	0,3	1,0	2,1	1,6	0,7	1,9	0,2	0,0
	Bion	7,1	10,6	11,0	6,1	4,8	4,5	-1,0	0,9	1,5	1,3	1,3	2,6	1,9	0,1

Tabla 16

	FAR	FAR	CSL	APOX	GST	POX	CAD	CaIs	PECT	EDS1	WRKY	LOX2	JAR	ACCO	EIN3
Riego normal	Agua	1,2	1,1	0,3	0,1	-1,2	-0,5	0,1	0,3	1,6	-0,3	-0,3	-0,2	0,2	-2,1
	Bion	4,0	5,5	0,1	1,6	2,0	-0,3	-0,2	1,5	4,7	5,9	-0,5	-0,3	1,8	-0,7
PEG a D-1	Agua	3,0	1,8	0,4	0,4	-0,9	0,0	0,0	1,6	1,3	0,2	0,7	0,2	0,9	-1,4
	Bion	5,9	4,7	0,9	1,1	1,0	0,1	0,3	2,7	4,4	5,1	1,1	0,5	2,1	-0,4
PEG a D0	Agua	2,8	1,7	0,6	0,4	-2,0	0,1	0,5	0,7	1,1	0,2	1,1	0,4	0,8	-1,6
	Bion	5,0	4,7	0,4	1,0	2,0	0,2	0,1	1,5	4,4	3,7	0,5	0,0	1,2	-0,9

Ensayo 4: Verificación de la capacidad de la herramienta para estudiar diversas variedades de manzano para su respuesta a los SDN

Método:

Este experimento se efectúa una vez sobre retoños jóvenes injertados, de 4 variedades en crecimiento activo: Braeburn, Gala, Granny Smith, MM106 criados, directamente en invernadero de experimentación.

** Para el análisis de las defensas*

Los retoños son pulverizados hasta el rechazo con un pulverizador de aire comprimido con Bion (0,4 g/l) o agua (D0).

Se efectúan unas extracciones de la hojas F3 (3º nivel foliar, hojas jóvenes todavía no completamente desarrolladas) el D0 (antes del tratamiento) y el D3 sobre el conjunto de los lotes tratados (tres 1/2 limbos extraídos de tres hojas F3 (hojas jóvenes no totalmente desarrolladas) agrupados/extracción).

Las muestras son extraídas y analizadas con la ayuda de la herramienta de manera idéntica a la del ensayo 2.

** Para el análisis del poder de protección*

Los retoños son pulverizados de la misma manera hasta el rechazo con un pulverizador de aire comprimido con Bion (0,4 g/l) o agua (D0).

El D4, las 2 hojas más jóvenes desarrolladas (F1 y F2) de cada retoño son cortadas, a 2/3 y perpendicularmente a la nervadura principal, con la ayuda de tijeras previamente sumergidas en una suspensión bacteriana de *Erwinia amylovora* preparada en agua estéril a 10^8 cfu/ml. Se han inoculado una docena de brotes en crecimiento activo por variedad y por tratamiento.

La anotación de los síntomas, es decir la presencia de una necrosis sobre la nervadura de las hojas inoculadas (marcado con 0,5), o que han alcanzado el pecíolo (marcado con 1), o que han evolucionado sobre el tallo (marcado con 1 + longitud de la necrosis sobre el tallo en cm), se realiza 3 semanas después de la inoculación. Se calcula la longitud media de la necrosis sobre los retoños pulverizados (μ_{agua}), y se estima la eficacia relativa de protección del Bion según la fórmula: $100 - ((Lg_{\text{Bion}} \times 100) / \mu_{\text{agua}})$.

Resultados:

El Bion provoca unas inducciones en las 4 variedades según un perfil cualitativo bastante similar (figura 2A).

Al nivel cuantitativo, no se observa una variedad que "responda" globalmente más fuertemente que otra. Las diferencias de niveles de inducción varían en amplitud según los genes.

En lo que se refiere a las eficacias de protección de estas 4 variedades por el Bion, frente al fuego bacteriano, se observan unas diferencias marcadas, siendo Granny Smith la variedad "que responde" mejor al Bion, y Gala, la que "responde" peor (figura 2B).

Conclusión:

La herramienta aplicada sobre las plántulas de Golden Delicious puede por lo tanto ser utilizada sobre otras variedades de manzano. Permite revelar la reactividad de las 4 otras variedades ensayadas en la presente memoria, Braeburn, Gala, Granny Smith y MM106, a un tratamiento con Bion, reactividad confirmada por las protecciones observadas después de la inoculación artificial por *E. amylovora*.

Listado de secuencias

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 6 INRA

<120> Dispositivo para determinar o estudiar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas o partes de plantas

<130> W637FR

<160> 93

<170> PatentIn versión 3.3

	<210> 1	
	<211> 304	
	<212> ADN	
5	<213> Malus domestica	
	<400> 1	
	tacctcaatt cccacaacgc cgctcgagca gcagtaggcg ttggtccctt gacgtgggat	60
	gacaatgtag caggctatgc aaaaaactac gccaaaccaac atgttggcga ctgcaatctc	120
	gtgcactccg gtgggccata cggtgaaaac cttgccatga gcactggtga catgtcggga	180
	gcagcggtcg tggacctgtg ggtggcggag aaagccgact acagtatatga gtcgaactcg	240
	tgtgctgctg gaaaggtgtg tgggcattat acacaggtgg tttggcgtaa ctcggctcgt	300
	gtag	304
10	<210> 2	
	<211> 320	
	<212> ADN	
	<213> Malus domestica	
15	<400> 2	
	tatgctcttt tcacagctcc gtcagtttta gtacaagatg gccaacgtgg ttatcgtaat	60
	cttttcgatg ccatttttga tgetgtttac gctgcgcttg acaaggtcgg tggaggatct	120
	ttggaaattg ttatatcgga gagtggttgg ccgacagctg gtgggacggc aacaacagtt	180
	gataatgcga ggacatataa ctcgaatttg gttcaacatg tgaaggagagg gactccaagg	240
	aagcctggaa ggcccattga aacttacatc tttgccatgt ttgatgagaa tagaaagacc	300
	ccagagcttg agaaacattg	320
20	<210> 3	
	<211> 609	
	<212> ADN	
	<213> Malus domestica	
25	<400> 3	
	aagccttcca agaacaacag agatattgta gattattgcc tgcttgattc ggaaaattac	60
	atatcacaac atggccggga agatcacagc aagctctgtg ttgtttgttt cgatcatgat	120
	ctgtggtttg gtcggcagtg cattgggaca aagtgcgacg aatgtgagag ccacatacca	180
	cctctacaat ccacagcaaa acaattacga cttgcgggca gtaagtgcct actgcgcaac	240
	atgggatgcc gataaatccc tcgaatggcg cagcaaatat ggatggactg ccttttgcgg	300
	acctgctggc cctactgggc aagccgcatg cggaagggtgc ctcttggtga caaacactcg	360
	gactggagct caagcaacgg tgagaattgt tgatcagtcg agcaacggag gattggactt	420
	ggacgtgaat gtttttaacc aaattgacac cgacggcaat ggttaccaac aaggccacct	480
	tatcgtcaac tacgaacttg tcgactgcgg cgactaaagc ctgtaaacct taattttttc	540
	aatagctata tagttctcta cttccagtat tggttaaggaa cttaactatg tattactaat	600
	aaataagct	609

<210> 4
 <211> 583
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 4

```
actacaaatt ttggtaaagc ttagctccca caatgagcct ccttaaaagc ctcttagttt    60
tctccatcct atgtgccatt ctcttctttg catcaaccaa tgcagctcga tttgacatcc    120
aaaacaactg tgcctacact gtatgggcag ctgctgtgcc aggcgggtggc cgccagctcg    180
gcaaaggcca atcctgggcc ttagatgtga gtgctgggtac caaaggggct cgcatttggg    240
gccggacggg atgcaacttc gatggagcag gacgtggcaa atgccaaacg ggtgattgtg    300
ggggtgtcct ccaatgccaa ggctatgttc aaccaccaa caccctagct gaatatgcc    360
ttaatcaatt taacaacttg gatttcattg acatctctct tgttgatggg tttaatgtac    420
ctatggaatt tagtcccacg tctggtgggt gcactaggag gattaggtgc acggctgata    480
ttaacgggca gtgccctaac caactgaggg ctccaggagg ctgcaacaac ccttgcaactg    540
tggtcaagac tgatcaatat tggtgcaatt ctggaaattg tgg                    583
```

<210> 5
 <211> 1011
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 5

```
atggcatcca aaacacaaac cctagcccta actctgtccc tcttgatcct catttcttca    60
tgcaagtccct cccaagccgc cggaatcgcg acgtattggg gccaaaacgg caacgaagga    120
accctagcag aagcttgcaa ctggggcaac taccagtttg ttaacatagc tttcctctca    180
acttttgga acaaccaagc ccctgtccta aacctcgccg gccactgcaa ccccgctagt    240
ggtacttgca cggggcagag tgccgacatc agaacctgcc aatcaaaaaa cataaaagtc    300
ctcctctcga ttggaggggc caccgaaact tactctctca cttcagctga tgaggcaagg    360
caagttgctg attacatctg gaacaacttc ctaggtggtc agtcagattc gcgcccgtt    420
ggggacgcgg ttttggaagg cgtcgatttc gacattgagt tgggtgggtac gcagttctac    480
gacgagctcg ccaggtcact caaaggacac aacggacagg gaaaaacggt ctatttagcc    540
gcagctccac aatgcccgtt ccgggatact cacctagacg gcgctatcca aaccggttta    600
tttgactacg tttgggttca gttctacaac aaccccttag cccaatgccg gtatgcagac    660
ggtaatgccg acgctctttt gagcagttgg aaccgatggg cctcggtttc ggccaccag    720
gtgttcattg ggttaccggc agctcctgag gccgctccga gcggcggatt tattcctgct    780
gacgctctca agtcacaagt tcttccaacg attaagaatt cgccaagta cggaggagtt    840
atgctttgga gcaggttcta tgacaacggt tatagtgcat ccattaagga cagcatctaa    900
ttaacttctc tgctcaatg gatgctacta cttgtaataa agtgtgttag ggatgatggc    960
gcctcattcc tttccttatg aataaaacat gcatatgtat tttttggagg c          1011
```

ES 2 522 551 T3

<210> 6
<211> 588
<212> ADN
<213> Malus domestica

5

<400> 6

aacaaaggca gctaaccatg gccaggtttt cggtcacgt ggcaatagtg ttcttatttg	60
tgatagctcc ttttgtcagt aatgccacca taacttgtgg tgaagtggta gcttggctca	120
ctccatgcat accctttgga gtgtttggag gcacagtgcc tccagattgc tgtaaaggca	180
taaaagagct gaatgctgca caaacacca cgatggaccg gagaattgct tgtagttgca	240
ttcaggaagg agctgcagca atccccggga ttaattatga ccggattaac actcttggtg	300
atgtctgtgg ctctccttgt ccttacaaag tttacccttc tacaattgct tctgcgtaa	360
gctgaatcca taggaggatt ggagaatgga gaataaagct tccgagaaga ctattcctcg	420
aagccatata gctagacaga cctcttagtt gtttaaatca caatgctttt gtggaactta	480
ataatttggga agggtcgaat cgttctgtat aaggattgta cgtaatccat taccatctat	540
taataattaa atgatccctt tttatacaaa aaaaaaaaaa aaaaatgc	588

10 <210> 7
<211> 717
<212> ADN
<213> Malus domestica

15 <400> 7

cgaattccgt tgctgtcgca cattaataga agttttgagg catcttaagt taagtttaaa	60
ccctaattag ccatgaaagg tgctcagttc ctcgtagtga ttgttgccat cttggcattc	120
gcaacctccc ttgtctctgc ctctgacccc agtccctccc aggacttctg cgttgccatt	180
aatgacacca aattaggggt gtttgtgaac gggaaatttt gcaaggaccc aaagcttgca	240
tcagcaaatg atttcttctt ttctgggctt caaattccaa gaagcacaca aaatccgttg	300
ggttcaacgg taacacctgc taatgtggat caaatagcag gactaaacac tctcggcata	360
tccctagctc gcatagactt tgcaccaaag ggcctaaacc ctccccacac tcacctcgc	420
ggcacggaaa tcctttttct ccaggaagggt acactctacg ttgggttcgt aacgtccaac	480
ccagataatc gtctattcac caaggtgttg aacaagggag atgtgtttgt gttcccagtt	540
ggctcttattc acttccaact gaatgtggga cataccagtg ctgtcgccat tgctggtctt	600
agcagccaga acccaggagt catcaccata gcaaatgcag tgttcggcgc caacctccc	660
atcaatcccg atgttctagc caaggccttc caagtcgatg acaaactgggt ttcatat	717

20 <210> 8
<211> 301
<212> ADN
<213> Malus domestica

25

<400> 8

gaggcatttg gaggagaatt gaggaacacc gtaaagaaca cggtagagcca agtcgcaaag	60
aggacttta caactggggt aaatggggag cttcaccct caagattctg cgagaaggat	120
ctcctcaaag ttgtcgatag ggagtatgtt ttgacctata ttgatgagcc ctgcagcgcc	180
acttatccat tgatgcaaaa actgaggcaa gtgcttggtg agcatgcttt gacaaatggc	240
gagagtgaga agaatgcaag cacttcaatc ttccaaaaaa ttggagcttt cgaggaagag	300
c	301

<210> 9

<211> 442

<212> ADN

<213> Malus domestica

<400> 9

atcacggcgg tgaccttccg tgggcctagt gacaccacc ttgacagtct tgtgggtcaa	60
gccttgtttg gcgacgggtg agcgcccgtc atcattggtg ccgaccagtc gccgaagtc	120
gagaagccct tgcctgaatt ggtctcggcg gcacaaacca ttctcgctga cagtgatggg	180
gctatcgacg gacatctccg tgaagtaggg cttacgtttc accttttgaa ggacgttccc	240
gggcttattt caaagaacat cgaaaagagc cttaacgagg cttcaagcc tataggcatt	300
tcggactgga actcactctt ctggattgca caccaggtg gccctgctat tctggaccaa	360
gtagaggcca agttggcggt gaagccggag aaattagaag cgacaaggca agtgttgcca	420
gattacggca acatgtcaag tg	442

<210> 10

<211> 290

<212> ADN

<213> Malus domestica

<400> 10

accggttgga tgtacttcgt ctcctttact ctagctgttc aagctgcatg gaaatatgcc	60
aaagaaaaca acattgattt catcaccatt atcccaactc ttgtaattgg gccatttctc	120
atgccatcca tgccaccaag cctcatcact ggactttcgc cgattttaag aaatgaatca	180
cattatggca tcatcaagca gggccagtat gttcacttgg acgacctctg cctttctcac	240
attcatctgt acaagcatcc aaaagccgag ggccgttaca ttgctcctc	290

<210> 11

<211> 1074

<212> ADN

<213> Malus domestica

<400> 11

atggtgagct ctgattcagt gaattcaagg gttgagacct tggccggcag tggaatctca 60
 accatcccaa aagagtacat cagacctaaa gatgagcttg taaacattgg tgacatcttc 120
 gaacaagaga agaacaacga agggcctcaa gttcccacca tcgatttgaa ggagatagag 180
 tctgataacg aaaaagttag agcaaaatgc agggaggagt tgaagaaggc agctgtggac 240
 tgggggtgta tgcaccttgt gaacctatggc atctctgacg agctcatgga caaggtcagg 300
 aaggccggta aggccttctt tgaccttccc attgagctga aggagaagta tgccaatgac 360
 caggcctctg gtaagattca aggctatgga agcaagcttg caaacaatgc atctgggcag 420
 cttgagtggg aggactactt cttccactgt gtatacccag aggacaagcg tgacttgtct 480
 atttggcctc aaacacctgc tgattacatt gaggcaaccg ccgagtatgc taagcaactg 540
 agggagctag caaccaaggt actgaaagt ctgtcacttg gcttgggatt ggatgaaggg 600
 aggctggaga aagaagttgg tggacttgaa gagtcctct tgcaaatgaa aatcaactac 660
 taccctaaat gccctcagcc ggagcttgca cttggtgttg aagctcacac tgacgtgagt 720
 gcactcacct tcatactcca caacatggtt cctggcctgc agcttttcta tgaaggaaa 780
 tgggtcactg ccaagtgcgt tccaaattcc atcgtcatgc acattgggga cacacttgag 840
 attttgagca atgggaagta caaaagtata ctccacaggg gcatggtgaa caaggaaaag 900
 gtgaggattt catgggcagt tttctgtgag ccaccaaagg agaagatcat ccttaagcca 960
 ctgccggaga ccgtgtccga ggaggagccg gcaatgttcc caccacgaac ttttgctgag 1020
 cacattcaac acaagttggt caggaagagt caaggggctt tgctcccaa gtga 1074

<210> 12
 <211> 1993
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 12

aaaccagaga gctaagccat gacgtctctt tcacctcgg tagtcaccac cccaccgtt 60
 cccaaccccg ccacaaaacc tctctcccc ttctctcaa acaactcca agtttcccta 120
 ctacaaaagc ccaagcgttc ctttgacgt aaggtctcat gcaaagccac aaacaatgac 180
 caaatgatc aagcacagtc caaactagac aggagaaatg tgcttcttg tcttgagggt 240
 ctatacggcg tggcgggtat gggcacagac ccgttcgctt ttgccaagcc tatagcccca 300
 ccagacgtat ctaaatgtgg toctgcagac ttgccacagg gtgcagtgcc caccaactgc 360

tgccccccgc	cttccacaaa	aatcattgac	tttaagctgc	ctgccccccgc	caaactccgc	420
atcagggcac	cggctcacgc	cggtgaccaa	gcctacaggg	acaaatacta	caaagcgatg	480
gagctcatga	aggccctacc	cgacgacgac	ccacgtagct	tcaagcaaca	ggcagccgtg	540
cattgcgctt	attgcgacgg	cgcctatgac	caagtcgggt	tcccagaact	cgagctccaa	600
atccacaact	catggctctt	cttcccgttc	caccgttact	acttgtactt	tttcgagaag	660
atcctaggca	aactcattaa	cgacccgaca	ttcgctttgc	cgttctggaa	ctgggactcg	720
ccagccggca	tgccactgcc	cgcaatttac	gctgatccaa	agtccccctc	ctacgacaag	780
ctccgatctg	ccaatcatca	gccccgact	ctggtcgac	tcgattacaa	cgggaccgag	840
gacaatgtgt	caaaggaaac	cacaatcaac	gccaatctca	aaatcatgta	caggcaaagt	900
gtgtccaatt	ccaagaatgc	taagttgttc	tttgggaacc	cgtacagggc	aggggacgag	960
cctgaccctg	gtggcggttc	catcgagggg	acaccacacg	cgccggttca	tttatggacc	1020
ggtgacaaca	cccagcccaa	ctttgaggac	atggggaatt	tttactccgc	tggtcgggac	1080
cccatatttt	ttgcacacca	ttcgaatgtc	gatcgaatgt	ggagtatttg	gaaaactctt	1140
ggaggtgaag	gaactgatct	tactgactcg	gactggttgg	actccggatt	cttgttttac	1200
aacgagaacg	cagagttagt	ccgagtcaag	gtcagggact	gcttgagagc	caaaaatctt	1260
gggtatgtat	accaagatgt	ggacattcct	tggctcagct	ccaagccaac	accggaagg	1320
gcgaaagttg	cattgagcaa	agtagcgaag	aagctgggag	ttgcacacgc	agctgttgcg	1380
tcgtccagca	aggtggtggc	aggcactgag	ttcccataa	gtctggggtc	gaagataagc	1440
acggtggtga	agagaccgaa	gcagaagaag	aggagcaaga	aggccaagga	ggatgaggag	1500
gagatattgg	tgattgaggg	aatcgagttt	gacagggacg	tggctgtgaa	gtttgatgtg	1560
tatgtgaatg	acgtcgatga	cttgccgagt	gggcctgaca	agacggagtt	tgccggaagc	1620
tttgtaagtg	tgccgcacag	ccacaagcac	aagaagaaga	tgaacactat	tttgaggtta	1680
gggttgacag	atttggttga	ggaaattgag	goggaggacg	atgacagcgt	ggtggtgact	1740
ttggtgcca	agttcgccgc	tgtcaagatt	ggtggtatca	agattgaatt	tgcttcttag	1800
ttagttatgt	caaccaggc	atcaagaatc	gtatgatcat	catcatgctt	ggatcgatca	1860
tgtgttgtaa	ttcttcaatt	tgggtggttt	gttccttttg	aatagtcaat	gttcgtgtac	1920
aaaataaaca	tgatgatgat	gtggtatttt	catcaccatg	aaatatgaat	taggaaatca	1980
cattttgttc	gtt					1993

<210> 13
 <211> 1827
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 13

10	atggacgtcc	gaaggcgatc	gacgatggat	acacctgcc	ccaaggccag	aagtgggccg	60
----	------------	------------	------------	-----------	------------	------------	----

atgaagggtga aagtgggtgga ccacgagaac gacgttggtg tcgtcggggc caaggcctcc 120
gacgccctgc cgtgcccgtt gtacctgact aacgccgtct gcttcaactct cttcttctcc 180
gtcgtctact tcctccttac tcgttggcgc gagaagatca agacctcgac gccgctccac 240
gtcgtgaacc tctccgagat cgtcgcgata ctgcgcttcg tcgcctcctt catctacttg 300
ctcggattct tcgggatcga tttcgtgcag tcgctcattc tccgccccag caatgacgtc 360
tgggccgccg acgatgacga ggaggagcac gagcgcttga tattgaaaga cgacgcgcgg 420
aaagtgccgt gtggggccgg actcgactgc agcccaattc cccaaattgc ctctgttgct 480
gctgccgcc ccaaagctgt tgcacagaag gtgtttgata aagaggtagt cctctccact 540
tcctgcgatt tcaccgccca gccgttgacg gaggaagatg aggagggtgt caagtccgtg 600
gtggcgggaa ccatcccttc ctactctctg gagtcaaagc tcggagattg caggagggcg 660
gcccgtatca ggcgcgagggc gcttcagagg atcacaggaa agtctctggg tggctcgcca 720
ttggaggggt tcgattacga gtcaattctg ggtcagtgct gcgagatgcc agttgggtat 780
gttcagattc cagttgggat tgctgggcct cttatgctcc atggcagaga gttttccgta 840
ccaatggcca ccaccgaagg ttgcttggtt gccagacca accgtggctt caaagctatc 900
aacttgccg gcggagccac cagtgtgttg ctgagagatg ggatgaccag agcaccttgt 960
gtgaggttca actctgctaa gagagctgcc gaggtagagt tctacttgga agaaccac 1020
aattatgaca ccttgccac gggtttcaac aggtcaagca gattcggtag gcttcagaca 1080
attaagtgtg ccattgctgg gaagaacttg tacatgagat tcacctgcag caccggtgat 1140
gctatgggga tgaacatggt ctccaaagg gtgcaaacg tcttggtatt cctccagaac 1200
gacttccctg acatggatgt gattggaatt tccggcaact actgctctga caagaagccc 1260
gctgcggtga actggattga aggccgcgga aaatcggtgg tctgtgaggc tgtgatcaag 1320
ggtgatgtgg tgcagaagg gtgaaaacc aatgtggcgt ccctgtgcga gcttaacatg 1380
cttaagaacc ttactgggtc tgcaatggct ggagccctcg gtggattcaa cgcacatgcc 1440
agcaacatcg tctccgccat ctacatcgt accggccaag acccagctca gaatgtggag 1500
agttctcact gcattaccat gatggaaccc atcaatgatg gacaggacct tcacgtgtct 1560
gtcaccatgc cttcaattga ggttggtact gttggagggt ggacccaact tgcattctaa 1620
tcagcttgct tgaaccttct tgagtgaaag ggtgctaaca gggaggcacc aggatcaa 1680
gcaagattgt tggccactgt tgtggctggt tctgttcttg ctggagagct ttctctcatg 1740
tctgctatct cagctggaca gcttatgaat agtcacatga aatactacag atcaagcaaa 1800
gatgtctcag ctgttgcatc cgcttaa 1827

<210> 14

<211> 1401

5 <212> ADN

<213> Malus domestica

<400> 14

```

atctctccctc 60
tctgtgagtc tgtgagtatc tggggagggc tctgagatta ccagtgtctg tgtgggtggcg 120
gattagattg gcaaaactga caatggcgga tctcaagtca aagtttctga aggtgtactc 180
cgttctgaaa tcggagctgt tggaagaccg tgctttcgac ttcaccaatg actctcgcca 240
atgggttgag cggatgctgg actacaatgt gcctggaggg aagcttaatc ggggattgtc 300
tggtattgac agctatcagt tggtgcaaca aggaagggaa ttaactgaag atgaaatctt 360
cctggccagc gctctcgggt ggtgcatcga atggcttcaa gcattttttc tgggttcttga 420
tgacatcatg gatggctctc acacacgtcg tggtcagcct tgctggttta gattgcccaa 480
ggttggtatg attgcagtaa atgatgggtg tgtgcttcga aaccatatcc caaggattct 540
cagaaagtac ttcagagaaa agccatatta cgtggatctt cttgatttgt tcaatgaggt 600
ggaatttcaa actgcctcag gtcagatgat agatttgatc actactatcg aaggagaaaa 660
agatctatcc aaatactcat tgtcaattca ccgccgtatt gttcagtaca agactgccta 720
ttactcattt tacctttccg ttgcatgtgc attgcttatg tcagggtgagg aactggaaaa 780
acatattgat gtaaaaaaca ttcttggtga gatggggatc tactttcaag tacaggatga 840
ttatttggtg tgctttggtg atccggaaac gattggtgta ataggaacag atattgaaga 900
tttcaagtgc tcttggttgg tggtgaaagc tttggaactc tgcaatgagg aacaaaagaa 960
agtactacat gagaattatg ggaaccaga ccagaaaat gtggcaacag taaaggccct 1020
ctacaaagaa ctcgatattg aggggtgtatt tgccgattat gagagcaaaa gctacaagaa 1080
actgacgagt tggattgaag ggcacccaag caaagcgtg caatcagtgt tgaagtcctt 1140
cttgggcaag atttacaaga ggcagaaata gaaatctcgg atctggattc agttcagccc 1200
ctcctatttg tatttggtgc atttgtaata aaacatgcag ttgcatttgg tttgcgtcag 1260
tcagagtcag gtttgcttca cttagttata agttgagtca tcagtgttga atgcagacag 1320
acaataagca tccacgttaa ttaatacaaa gtttctcagt ttccagttga gaatattaaa 1380
aaaaaaaaa a 1401

```

<210> 15
 <211> 562
 <212 > ADN
 <213> Malus domestica

<400> 15

```

cagcattgca gctatcgaaa gcgacaatct cggcacaaga gacgatctct atggtactgc 60
attacacttc aagatcctca ggcagcatgg ctataaagtt tcacaagata tatttggtag 120
attcatggat gaaaagggca cattagagaa ccaccatttc gcgcatttaa aaggaatgct 180
ggaacttttc gaggcotcaa acctgggttt cgaagggtgaa gatatttttag atgaggcgaa 240

```

ES 2 522 551 T3

	agcttccttg acgctagctc tcagagatag tggatcatatt tgttatccag acagtaacct	300
	ttccagggac gtagttcatt ccctggagct tccatcacac cggagagtgc agtggtttga	360
	tgtcaaatgg caaatcaacg cctatgaaaa agacatttgt cgcgtgaacg ccacgttact	420
	cgaattagca aagcttaatt tgaacgtaag tgaggcccaa ctgcaaaaaa acttaaggga	480
	agcatgcagg tggatgggcaa atctgggctt gggagacaac ttgaaatttg caagagatag	540
	actgggtgaa tgttgctgat gt	562
5	<210> 16 <211> 198 <212> ADN <213> Malus domestica	
	<400> 16	
	ggatacgaca ctatgaagaa tcgctgggaa aaattgacca acaccctgtc tgtttccaat	60
	cgctttttctc tacagaaaat tgaaccccaa tattgcactt actttcagaa aattagagaa	120
	ccctcaccag cttatgcgtg ggtgaagtgc gagagggaag aagataaaga ttgctacaaa	180
10	atactggaag aagcaaaa	198
15	<210> 17 <211> 625 <212> ADN <213> Malus domestica	
	<400> 17	
	ggatgcccc gtgccaccac cagaggccgt cttcctgatg ctaccaaggg taatgaccat	60
	ttgagggatg tcttttgcaa gaccatgggc ctcagcgaca aggatattgt tactctctcc	120
	ggtggtcaca ccctgggaag gtgccacaag gagcgcctg gatattgaagg accttggaact	180
	cccaaccccc ttatctttga caactcctac ttcaagggtgc ttcttggtgg agaccaggaa	240
	ggtcttctaa tgcttccaac tgacaaggct cttctggatg accctgtctt ccgccctctt	300
	gtggaaaaat atgctgcgga tgaagatgct ttctttgctg actatgctga atctcacatg	360
	aagctctccg agcttgggtt tgctgaggcc taagcagagc tggagaacta caagggatga	420
	agccgatgcc tgtgcgcctt gcttttgtat ttttgatgc ctcttggttg tgaggttgta	480
	ggcagttggt gcttttcttt tttatctatc agatttttagg aaagtgggac ttctagtctg	540
	atttgaagaa cgaatgtttt taaactggat ggaatgctgg ttatcatcct cggtgattaa	600
20	ataatactgt aattttcaaa aaaaa	625
25	<210> 18 <211> 650 <212> ADN <213> Malus domestica	
	<400> 18	
	ggctgccatc aaggctccac gaaacgttat ttcgaccgct gcaatgcgag tttttgctac	60

tctctacgag aaagacatcg aattcgagct tgttccaatc gacatgagag ctggtgaaca 120
 caaaaaggag cccttcatat ccctcaatcc atttgggtcaa gttccagcat tcgaagacgg 180
 agatcttaag ctctttgaat caaggcgat tacacaatac attgcccacg agtatgctga 240
 caagggaacc cctctagtga tccgagactc aaagaagatg gcaattatat cattgtggtc 300
 ggaggtggag gcccaaaagt tcgacccggc ggccacaaaa ctgacctatg agctagctat 360
 aaagcctatg tttaaaatga ccacagacgc ggaggtgtg gaggaaaatg aagccaagtt 420
 ggctgtggtt cttgatgtat atgagactcg tctggctcag tcgaaatact tggcaggtga 480
 aagcttcaact ttggctgatc ttcaccacct cccaccata cattacttga tgggaacaca 540
 atcgaagaag ctgttcgaat cccgcccccc atgttctcgc atgggtggcg gatatcacag 600
 caaggccagc ttggaacaaa agtcgttgcc cagcaaaagt gaaaacaagt 650

<210> 19
 <211> 503
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 19

cttcttcttc tctctttgct tcttagttat attggttacc agaaaccttg ttagatatta 60
 gtcattgggtt catatattac tggttcatgc actcccacaa aactaaaat ctcatgtca 120
 ttattattcc ttcttgttgg agtagcttct gctcaattgt cctctacttt ctatggaaca 180
 tcgtgtccta atgccctgac caccataaaa tcggcagtggt actcagcggg gtcgaaggaa 240
 gctcgcattg gagcttcctt gcttcgtctt catttccatg attgctttgt taatggatgt 300
 gatgcttcgg ttctgctgga tgacacagcc aatttcacag gagagaaaac agcaggtgct 360
 aatgctaatt ctttgagggg atttgatgta atcgatacaa ttaaactctca attggagagt 420
 ctctgcccc aagtagtctc ttgtgctgac atcttaactg ttgctgctag ggactctatt 480
 gttgcattgg gtggacttac cta 503

<210> 20
 <211> 562
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (472)..(472)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 20

gatattatta gctttgcgct ttttcattta ccagtatggg ctagtctatc accttaacat 60
 cacaacaac aaaagtttcc tggatatggg tgtttcgtgg ctcgatgatca ttctagtttt 120
 gtgtctgatg aaggctgtgt ctgctggaag gcgacgatta agtgcagact atcagctttt 180

gtttcgactg gttaagggat ttatatttat tacattttta gccatcttca ttaccttaat 240
 agtggccct catatgacac ttogggatgt tgtagtgtgc attcttgcct tcatgccaac 300
 gggatgggga ttgcttttga ttgcgcaagc ttgtaagcca ctaattaaac gagcagggtt 360
 ttgggaatca gttcaaacac ttgctcgcggtt ttatgaaata atcattggat tgcttctttt 420
 taccgccgtt gcattcttgg cttgggtttcc gtttgtttcc gaattccaaa cncgaatgct 480
 cttcaaccaa gcattcagca gaggtttaca gatctcacgt attcttggag gacaaaagaa 540
 gggctctcac tcctccaaca aa 562

<210> 21
 <211> 580
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 21

gcttactaat caacagacat gccaaaatgg tttcaaaaac ctcaacattc ctagttctca 60
 tttgcaatct ttcccaaact acgtcacgct ctcaaccaac ttgtccaaga tgcttagcaa 120
 ctcactatca atacacaagg tctcaacttc ttcacagct ctacatttta gcaaacaagt 180
 tcgtggaaga cgacggcggtt tgctttcgga tgatgggttc ccagaatggg tttcagccgc 240
 tgatcgaag ctgctacaat cgataggttag cggaccaaac gctgatatgg tagtagcaca 300
 agacgggtcc gggaattaca agtcaatttc tgaagctgtg gatgctgcgt acaagctaca 360
 ggggtggggcg actaaaagggt ttgtcataca cgtgaaggca ggagtttaca gagaaaatat 420
 cgagattaag aggacaatga agaacatcat gttcattgga gatggtatcg atgcaacgat 480
 tgtcacaggg aataaaaatg cccaagatgg ttcaactaca tatcgctctg ccacatttgg 540
 ggctaccgga gatggcttta ttgctcaaaa cttgaaattc 580

<210> 22
 <211> 1262
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 22

ggcacgagga gagagatgag cagcggagca gggaaaggctg tgtgcgtcac cgggtgcgtct 60
 ggatacattg cttcatggct cgttaagctt cttctccagc gcggctacac cgtcaaggcc 120
 tctattcgcg acccaaata tccaactaag acagagcacc tgcatgcgct tgatggagcc 180
 caagacagac ttcaactttt caaagcaaat ctgttgaag aagggttctt tgactctgct 240
 gttgagggtt gtgaaggcgt attccatact gcatctccct tttatcatga tgtcacagac 300
 ccaaaggcag aactacttga acctgcggta aaggggaccc ttaatgttct taattcgtgt 360
 gcgaaatcac catcaatcaa acgggtggtt ttgacatctt ctatagccgc tgtagcatat 420
 aatggaaagc ctcgaaactcc tgatgtagta gttgatgaga cttgggtttac agatccagat 480
 gtttgtaagg aatcaaagct ttggtacgtg ctttcaaaga ctttggctga agatgctgcg 540

ES 2 522 551 T3

tggaatttg	taaaggagaa	gggtattgac	ttggttacaa	ttaacccgc	aatggtgata	600
ggctcctctgt	tacagccaac	tcttaataca	agtgtgcag	cagttttaa	tgattataag	660
ggagctcgaa	cttttcctaaa	tgcaagtttt	ggatggatta	acgttaaaga	tggtgccaat	720
gcacatatctc	aagcatttga	gaggcctacc	gctagtggca	gatattgttt	ggttgagaga	780
ggtgcccact	tctcagaagt	tgtgagaatt	ttacgtgagc	tgtaccctac	tttgcaactt	840
ccagagaagt	gtgcagacga	caagcctttt	gtgccaacat	atcagggtgc	caaggagaag	900
gcgaagagct	tggtgtgcga	atttattcca	ctagatgtta	gcctcaagga	aacagttgaa	960
agtctgaagg	aaaaggggtt	tgtcaatttc	tgagtcattt	cagtacgggt	aagatgtttg	1020
aagtaaatct	agtcgcggta	aaacatatta	tctgcttcca	gtttgtgttt	ccggttggtg	1080
acttaaaact	cggtttccct	ttttcgggtt	aagacttgct	gtccagcttg	ttgattccta	1140
tagatcacca	ttgtgtgtgc	agaataaaga	agaaatgaac	cttttgaata	aaatcttgga	1200
atcgtctgag	taaagtgcgc	tcatgcaact	ttatcccat	tgataaaaaa	aaaaaaaaaa	1260
aa						1262

<210> 23
 <211> 637
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (585)..(585)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 23

aaaaaggga	tgaaagcttg	gagagatgct	ggatataggg	gaggagacta	tcaagaaaag	60
ctgctctctt	gccttgagg	cacacaaatt	cccagtgaa	ccgtttcttg	tgagaaactc	120
tgctgcagga	tcatcagatg	ttgttatcag	ctttcctgca	ggaacttgg	ctgtggagag	180
tttgttttct	ggagaaagt	attttggaga	agcaaaagtc	gatctcgaa	tctttccttc	240
cttgaaaagt	gttggaact	atgatccagc	aaagccagaa	gagatagact	ttgcaattgc	300
aactatcaac	caagcattcg	ttgacaaagt	taaacaaata	ttggacaatt	cccagctgaa	360
aatcaagggt	caagaggcca	tactgcaaa	gaagagaata	atatttaccg	gccactctac	420
cggcggtgca	attgctgcgt	ttgtcacaat	ctggttctta	gaaaattgct	cgaaagaaat	480
cagtggatct	ttcttctgtg	tgactttcgg	atctccctt	attggtgacc	acattatttc	540
tcatgctctt	aggagagaaa	attggtctga	atacttcata	cattntgtca	tgagatatga	600
cattgtccct	cggattttgc	ttgtcctct	gtcatcc			637

<210> 24
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 24

caggtaactt	cgctcctata	tctcatgtgc	tgctactgac	aatggagaa	ctgcaatata	60
cattgggagc	aaaagagtct	tgtaaatgag	ctagcacaag	ggagggatct	ggctaggcag	120
ctacagatcc	atctcaacgt	tccatcttcc	tcttatggaa	cccgggaatt	gctgggtcaa	180
aagatcatac	tttctgtacg	aaaagcgctt	tccatgctga	actctagcag	ctcagcctca	240
gaaggtagc	aacaacagcc	cacaggtcat	gttgcaattc	gaatgggtga	gtctccgccg	300
cattcgctaa	atgaaagtcc	ccggagtga	gactccgacc	gc		342

<210> 25
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 25

ggaggtctgc	taaagctcat	gtccttgccc	acgattctgg	ttatcatcag	cttgtagtc	60
actggctacg	aacacattgt	gccacagaac	cctacataat	cgccacaaat	cggcaactga	120
gtgtcatgca	ccaatctat	agattgttac	atccccattt	cagatacacc	atggagatta	180
attctcttgc	tcgtgaatca	cttatcaatg	ccggtggtat	catcgaaacc	tcattttcgc	240
ccaaaaagta	ctcccttgag	ctctgctctg	ttgcgtatgg	gaaggaaatgg	cggtttgacc	300
aagaggcact	cccagctgac	cttattagaa	ggggcatggc	tgttgaggac	ccaactgctc	360
cacatgggct	aaggctaaca	attgaagatt	acccttttgc	caatgatgga	ctcctcttat	420
gggatgctat	taaacaatgg	gtcactgact	atgtaaacca	ctactacca	gactccagca	480
ttgtccagac	tgatcaagag	ctccaagcat	ggtggacaga	aatcaaaaca	gttggccatg	540
ctgacaaaaa	agatgagcca	tggtggccag	aactcaaac	tccggaagac	ctaattgggca	600
tcatacaaac	aatgggttgg	gtagcatctg	gtcatcatgc	agctgtca		648

<210> 26
 <211> 630
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 26

tttttttttt	ttagataaag	ttaaacttta	tttctgatcc	aaactcatga	ttttgacatg	60
taacttatct	gatccggaag	aatttaaccc	tccatatccg	tttgccaaat	acaataatgt	120
tgctaattag	catatgcagt	gctgtaaaacc	cttttagtgg	tgcataaatt	gagaatgctc	180
aagagcacct	tgttgctagt	gcacctaggg	gtcttgaatt	ggctcaatgc	cgatccattt	240
cctatgaaat	attccaaaat	tttcttgaac	gttcccttct	ccacaatccg	aagctctaga	300
ggtccgatcg	aattacttcg	cctcgagaca	acgtaaccat	gatccacgaa	agatgcatcc	360
atttctctgc	aacattcacc	aagaaccctc	tcttcaactt	ctcctttgat	ctcccagtat	420
attatgtagt	ggcctgggtg	ggtcagcaca	tcagcatggc	ttgtgaagtc	aatcagttct	480
gctttggact	tgctcaatag	ttgagaccct	ctctccacca	ccatttgaag	gtccttttca	540
gtgtttttcac	acaactctct	gcatttctgc	tctgcccacc	cactaaatca	cttgacacac	600
ccacaccggc	aatggacctc	ctcctcctgg				630

<210> 27
 <211> 1214
 <212> ADN
 5 <213> Malus domestica

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (999)..(999)
 10 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 27

 ccaaacactt gtagagcgag agagagagag agagagagag agagagagaa aatggagAAC 60
 ttcccagtta tcaacttgga gagcctcaat ggtgagggaa gaaaagctac aatggaaaag 120
 atcaaagatg cctgtgagaa ctgggggtttt tttgagctgg tgagtcattg gattccaact 180
 gagtttctgg acacagtgga gaggctgaca aaagagcact acaagcagtg tttggagcaa 240
 aggttcaagg agctggtggc cagcaaaggc cttgaggggtg ttcagacaga agtcaaagat 300
 atggattggg aaagcacttt ccacttgccg catcttcctc aatcgaacat ctctgaagta 360
 ccagatctca aggatgagta caggaatgtg atgaaggagt ttgcattgaa attggaaaaa 420
 ttagcagagc agctgctgga cttgttgtgt gagaatcttg gactggaaca agggtagcctt 480
 aagaaggcat tttatggaac aaagggacca acttttggca ccaagggtgag caactaccct 540
 ccatgtccca acccagacct gatcaagggt ctccgggccc acaccgatgc cggcggcctc 600
 atcttgcctt tccaggatga caaggtcagt ggcctccagc tcctcaagga cggagagtgg 660
 gttgatgtgc ctcccatgcg ccactccatt gttatcaatc ttggtgacca acttgaggtg 720
 atcaccaacg gaaagtacaa gagtgtggaa cacagggtga ttgccccaaac agatggcacc 780
 agaatgtcaa tagcttcatt ctacaacca ggcagtgatg cggtagatcta cccagcacca 840
 accctagtgg agaaagaagc agaggagaag aatcaagtgt acccgaaatc cgtgttcgaa 900
 gactacatga agctctatgc tgggggtcaag ttcgaggcca aggaaccaag atttgaagcc 960
 atgaaagcag tggaaattaa ggccagtttt ggtttgggnc cagttataag tactgcttga 1020
 gagtgattaa atacttttac tagaagctgt tggaaaaaag ggttggttgc ttaaaagtaa 1080
 ttatgggtgt gtgaacgaaa tttttccttg aactagattt caagggttta tttactatta 1140
 atgtggaac cgttgtagaa agtaaccaat gtgatcacta ctttattata tataatatga 1200
 cttcaagatt tggt 1214
 15
 <210> 28
 <211> 616
 <212> ADN
 20 <213> Malus domestica

 <400> 28

cacttcttga gagcttggag gaagggcttg tcaaagtga tcttaacgga tgcttgaatt 60
 tgacagatga agtcgttatg gcgttgggta ggctacatgg ggaaacttta gaagtactga 120
 atcttgatgg ttgcagaaag attactgatg caagcttggc gacaatcgca aacaactgct 180
 tgtttcttctg tgagctagat gtgtcgaagt gtgcgattac agattctggc cttgctgccc 240
 tttcttccgc agatcagatc aacttgcaag tcctctccat ttctggctgt tctgaaatct 300
 cacacaaaag cctcccttcc ctgaaaaaat tgggccagac cctggtgggg ttgaatctcc 360
 aacattgtac tgcactcagc tacagatcaa ttgagctact tgtggagagc ttgtggagat 420
 gcgatatctt ggcctaataa ggaatagaac aatacgcgta tatacggaag gagagaagca 480
 gatatgaagt aggggtaaga tcaagaaatc aaaagaattc gggtagatt cgtcagttcg 540
 tagatgttaa gcactcacac gggtatccac gttcagcata caacatTTTT ggcccgttgg 600
 tagtggcctt gctggt 616

<210> 29
 <211> 596
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 29

tggtcaatgc tggtggtggt ggtactggtt ctgggttggg gtccttgctc ttagaacgct 60
 tgtcggtgga ttatggaaag aagtcaaagc ttgggttcac catctatcct tctccgcagg 120
 tttcaacagc agttgttgag ccttataata gtgttctctc tactcatgcc ctccttgaac 180
 acacagatgt atctgtgctc ttggacaatg aagctatcta tgatatttgc aggagatccc 240
 tagacatcga gagaccaact tacaccaatt tgaatagact gatatcacia gtcatatcct 300
 ccttgacaac atcattgaga tttgatggag ccattaatgt tgatgtgaca gagttccaga 360
 caaaccttgt tccatatccc cgcattccatt tcatgcttcc ctcatatgcc cctgttatct 420
 cagctgctaa ggcataccat gagcagatct caatccctga gatcaciaat gcagtttttg 480
 aaccctcaag catgatggcc aagtgtgatc cccggcatgg aaaatacatg gcctgctgcc 540
 taatgtacag ggggtgatga gttcccaaag atgtcaatgc tgctgttgca actatc 596

<210> 30
 <211> 703
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 30

accataacaa atggcagata cagaagacat tcaacctctc gtctgtgata atggcactgg 60
 aatgggtaag gctggatttg ctggagatga tgctccgagg gctgttttcc ccagtattgt 120

tggtcgtcct agacacacag gtgttatggt ggggatggga cagaaggatg cctatggtgg 180
 ggatgaggcc cagtcgaaaa ggggtattct cacattaaaa taccocattg aacacgggat 240
 tgtagcaat tgggatgaca tggaaaagat ctggcatcat actttctaca atgagcttcg 300
 tgtcgtcct gaagaacatc ctgtgcttct tactgaagca cctctgaatc ctaaggccaa 360
 cagggaaaag atgactcaga tcatgtttga gaccttcaat gtccctgcta tgtatgttgc 420
 cattcaagca gttctctccc tctatgctag tgggctact acaggtattg tgcttgactc 480
 tggatgatga gtcagtcaca ctgttcccat ctacgagggt tatgcacttc cacatgccat 540
 cctccggctt gaccttgctg gacgagactt aacagattcc ttaatgaaga tcctgactga 600
 gagaggggat acttttacta ctactgctga acggggaatt gtgcgtgaca ttaaagagaa 660
 gcttgccat gtggcccttg cttatgaaag ggaatcggaa tcg 703

<210> 31
 <211> 545
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

<400> 31

acaggttcgg aattgttgag ggtctcatga ccacggtgca ctccatcact gccacccaaa 60
 agactgttga cggtoctca atgaaggact ggagaggtgg acgtgcagct tccttcaaca 120
 tcattcctag tagcactgga gctgccaaag ctgttggaag ggtgctccca tctcttaatg 180
 gaaaattgac cggaatgtcc ttccgtgtgc ccactgttga tgtttccgtt gttgacctga 240
 ctgtcaagct tgagaaggct gcaacctatg aacagatcaa ggccgctatc aaggaggagt 300
 ctgaaggcaa gttgaagggt atcttgggtt acaccgaaga tgatgtcgtg tccaccgact 360
 tcattggtga cagcaggtca agcatctttg atgccaaggc tggaattgca ttgaatgaca 420
 actttgtcaa gcttgtctca tggtagcaca acgagtgggg ttacagttcc cgtgtggtag 480
 acttgatcgt gcacgtagca tcgagtctct aggggtttta ggttatggtt tgggagttca 540

caata 545

<210> 32
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 32

agcacacgag ttcgactcat aa

22

<210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 33

	cacaaaacta cgccaaccaa	20
5	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 34	
15	aattgttata tcggagagtg	20
20	<210> 35 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
25	<400> 35	
	tggcaaagat gtaagtttc	19
30	<210> 36 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
	<400> 36	
40	gaaggtgcct ctggtg	17
45	<210> 37 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
50	<400> 37	
	cgtcggtgtc aatttg	17
55	<210> 38 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
60	<400> 38	
	aaaggggctc gcatttg	18
65	<210> 39 <211> 19	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador	
	<400> 39	
	ctggcattg gaggacacc	19
10	<210> 40	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 40	
20	ccaagcccct gtcctaaacc tc	22
	<210> 41	
	<211> 22	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
30	<400> 41	
	caactgcct tgcctcatca gc	22
35	<210> 42	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 42	
45	agtggtctta ttgtgatag c	21
	<210> 43	
	<211> 19	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
55	<400> 43	
	caactacaag caattctcc	19
	<210> 44	
60	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> cebador	

	<400> 44	
5	gcctaaaccc tccccacact c	21
	<210> 45	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 45	
15	catctccctt gttcaacacc ttgg	24
	<210> 46	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
25	<400> 46	
	ggatctcctc aaagttgtcg	20
30	<210> 47	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 47	
40	ctcactctcg ccatttgc	19
	<210> 48	
	<211> 19	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 48	
	attggtgccg acccagtc	19
	<210> 49	
55	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> cebador	
	<400> 49	
65	aatccagaag agtgagttcc agtcc	25

	<210> 50	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 50	
10	cggttgatg tacttcg	17
	<210> 51	
	<211> 17	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 51	
	tgtgagaaag gcagagg	17
25	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 52	
35	gcctcaagtt cccaccatcg	20
	<210> 53	
	<211> 22	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
45	<400> 53	
	gaagtagtcc tccactcaa gc	22
	<210> 54	
50	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> cebador	
	<400> 54	
	tgcccgccgc ctccac	17
60	<210> 55	
	<211> 25	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 55		
5	gctccatcgc ttgtagtat ttgtc	25	
	<210> 56		
	<211> 18		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
15	<400> 56		
	aacaggtaa gcagattc	18	
20	<210> 57		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 57		
30	ttgtcagagc agtagttg	18	
	<210> 58		
	<211> 19		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
40	<400> 58		
	tcttggttg tggtgaaag	19	
	<210> 59		
45	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> cebador		
	<400> 59		
	ctgcctcttg taaatcttg	20	
55	<210> 60		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 60		
65			

	gatatttag atgaggcgaa agc	23
	<210> 61	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 61	
	gcgttgattt gccattgac	20
15	<210> 62	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 62	
25	caccctgtct gttccaatc g	21
	<210> 63	
	<211> 25	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
35	<400> 63	
	agcaatcttt atcttctcc ctctc	25
	<210> 64	
40	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador	
	<400> 64	
	gctccaact gacaaggctc ttc	23
50	<210> 65	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 65	
60	cgcacaggca tcggcttc	18
	<210> 66	
	<211> 23	
65	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 66	
	gagcccttca tatccctcaa tcc	23
10	<210> 67	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 67	
20	gcctccacct ccgaccac	18
	<210> 68	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
30	<400> 68	
	tgctcattatt attccttctt gttg	24
	<210> 69	
35	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> cebador	
	<400> 69	
	aaccgaagca tcacatcc	18
45	<210> 70	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 70	
55	tgcttcatg ccaacgggat g	21
	<210> 71	
	<211> 23	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
65		

	<400> 71	
	cggaacaaaa cggaaccaa gcc	23
5	<210> 72 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 72	
15	ggaggaggagg tcaactgg	18
	<210> 73 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 73	
	caaacaactt ctctccaaa cc	22
30	<210> 74 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
	<400> 74	
40	ggagcccaag acagactca ac	22
	<210> 75 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<400> 75	
50	cgccttcaca accctcaaca g	21
	<210> 76 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador	
60	<400> 76	
	tggagaaagt gattttggag aagc	24
65	<210> 77	

	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 77	
10	agaaccagat tgtgacaaac gc	22
	<210> 78	
	<211> 25	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 78	
	aatacatt gggagcaaaa gagtc	25
	<210> 79	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador	
	<400> 79	
	agagttcagc atggaaagcg	20
35	<210> 80	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 80	
45	gttgcgtatg ggaaggaatg g	21
	<210> 81	
	<211> 26	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
55	<400> 81	
	ggtagtagtg gttacatag tcagtg	26
60	<210> 82	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

	<223> cebador	
	<400> 82	
5	cgttcccttc tccacaatcc	20
	<210> 83	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
15	<400> 83	
	gggttcttg tgaatgtgc	20
	<210> 84	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador	
	<400> 84	
	gttggtgctg ggtagatcac	20
30	<210> 85	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 85	
40	acggagagtg ggtgatgtg	20
	<210> 86	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 86	
	cgttatggcg ttggttagg	19
55	<210> 87	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 87	
65	cagaaatgga gaggactgc	20

5	<210> 88 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
10	<400> 88 gttcaatgct gttggtggtg	20
15	<210> 89 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador <400> 89 ctgcggagaa ggatagatgg	20
25	<210> 90 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador <400> 90 caacctctcg tctgtgataa tg	22
35	<210> 91 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador <400> 91 gcatccttct gtaccatcc	19
45	<210> 92 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador <400> 92 gctgccaagg ctgttgaa	19
55	<210> 93 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador <400> 93 gctgccaagg ctgttgaa	19
65	<210> 94 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>

<223> cebador

5 <400> 93

cagtcaggtc aacaacggaa ac

22

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para determinar o estudiar el estado de estimulación de las defensas naturales de plantas o partes de plantas, comprendiendo dicho dispositivo unos medios de determinación del nivel de expresión en ARNm expresado por una combinación de genes diana en una muestra de plantas o partes de plantas, comprendiendo dichos medios de determinación:

(a) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes dianas siguientes: PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15;

(b) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: PAL, CHS, DFR, ANS, PPO;

(c) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: HMGR, FPPS, Far;

(d) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm del gen diana CSL;

(e) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes siguientes: APOX, GST, POX;

(f) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: CalS, Pect, CAD;

(g) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: EDS1, WRKY;

(h) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: LOX2, JAR;

(i) un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos un gen diana seleccionado de entre los genes diana siguientes: ACCO, EIN3.

2. Dispositivo según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende los medios de determinación del nivel de expresión en ARNm de los genes siguientes:

(i) para el grupo (a), un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de uno por lo menos de los genes siguientes: PR-1, PR-2, PR-4 y/o PR-8, un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm del gen PR-5, un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm del gen PR-14 y un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm del gen PR-15,

(ii) para el grupo (b), un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm del gen PAL, un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de uno por lo menos de los genes siguientes: CHS, DFR o ANS, y un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm del gen PPO,

(iii) para el grupo (c), un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de por lo menos uno de los genes siguientes: HMGR y Far, y un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm del gen FPPS,

(iv) para el grupo (e), un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm del gen APOX y un medio de determinación del nivel de expresión en ARNm de uno por lo menos de los genes siguientes: GST y POX.

3. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que comprende los medios de determinación del nivel de expresión en ARNm de la combinación de los genes diana siguientes: PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15, PAL, CHS, DFR, ANS, PPO, HMGR, FPPS, Far, CSL, APOX, GST, POX, CalS, Pect, CAD, EDS1, WRKY, LOX2, JAR, ACCO, EIN3.

4. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dichos medios de determinación del nivel de expresión en ARNm de un gen diana se seleccionan de entre los fragmentos de ácido nucleico capaces de hibridarse de manera específica a los ARNm expresados por dicho gen diana o a los ADNc correspondientes, o a unos fragmentos de dichos ARNm o de dichos ADNc.

5. Dispositivo según la reivindicación 4, caracterizado por que los fragmentos de ácido nucleico consisten en unos cebadores nucleotídicos que se hibridan específicamente con los ARNm, los ADNc o unos fragmentos de éstos.

6. Dispositivo según la reivindicación 5, caracterizado por que dichos cebadores nucleotídicos están adaptados para

la determinación del nivel de expresión en ARNm de los genes diana por un método de PCR cuantitativa.

7. Dispositivo según la reivindicación 6, caracterizado por que los cebadores se seleccionan de entre las secuencias siguientes, SEC ID nº 32 a 87.

8. Dispositivo según la reivindicación 4, caracterizado por que dichos fragmentos de ácido nucleico están inmovilizados sobre un soporte.

9. Dispositivo según la reivindicación 8, caracterizado por que consiste en un chip de ADN.

10. Procedimiento para identificar un perfil de expresión en ARNm de una combinación de genes diana que permite determinar, o por lo menos evaluar, un estado de estimulación de las defensas naturales de plantas o de partes de plantas, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

(i) determinar el perfil de expresión en ARNm de una combinación de genes diana por medio del dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 9, en un conjunto de plantas o de partes de plantas, cuyo estado de estimulación de sus defensas naturales es conocido, y después

(ii) determinar un perfil de expresión en ARNm de dicha combinación de genes diana correspondiente a un estado determinado de estimulación de las defensas naturales de dichas plantas o partes de plantas, partiendo de los datos procedentes de la etapa (i).

11. Procedimiento para determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales de una planta o de una parte de planta, que comprende las etapas siguientes:

(i) extraer una muestra a partir de dicha planta o de dicha parte de planta,

(ii) determinar el perfil de expresión en ARNm de una combinación de genes diana en dicha muestra extraída en la etapa (i), por medio del dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 9,

(iii) comparar el perfil de expresión en ARNm obtenido en la etapa (ii) con un perfil de expresión en ARNm de referencia,

(iv) determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales de dicha planta o de dicha parte de planta, a partir de dicho perfil de expresión en ARNm obtenido durante la etapa (ii).

12. Procedimiento para seleccionar una sustancia que tiene la propiedad de modular el estado de estimulación de las defensas naturales de una planta o de una parte de planta, que comprende las etapas siguientes:

(i) poner en contacto dicha planta o dicha parte de planta con la sustancia a ensayar,

(ii) determinar el perfil de expresión en ARNm de una combinación de genes diana en una muestra extraída a partir de dicha planta o de dicha parte de planta tras la etapa (i), mediante el dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,

(iii) comparar el perfil de expresión en ARNm obtenido en la etapa (ii) con un perfil de expresión en ARNm de referencia, para determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales en dicha muestra,

(iv) seleccionar positivamente dicha sustancia si la comparación en la etapa (iii) muestra que dicha sustancia ensayada en la etapa (i) modula el estado de estimulación de las defensas naturales de dicha planta o de dicha parte de planta.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, para seleccionar una sustancia que tiene la propiedad de generar un estado de estimulación de las defensas naturales de una planta o de una parte de planta que pertenece a la familia de las *Rosaceae*, que asegura una protección frente a un estrés biótico, caracterizado por que el perfil de expresión en ARNm de referencia en la etapa (iii) corresponde a los valores observados para unas muestras de plantas o de partes de plantas no sometidas a un estrés o un estimulador de las defensas naturales, y por que la etapa (iv) consiste en seleccionar positivamente dicha sustancia ensayada si el perfil de expresión en ARNm obtenido en la etapa (ii), y comparado en la etapa (iii), muestra una sobreexpresión en ARNm de la combinación de genes diana siguientes: PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, HMGR, Far, CSL, POX, Pect, EDS1 y WRKY.

14. Procedimiento para seleccionar una planta que presenta un estado de estimulación de las defensas naturales susceptible de conferirle una resistencia mejorada a por lo menos un estrés biótico y/o abiótico de interés, que comprende las etapas siguientes:

- 5 (i) aplicar dicho o dichos estrés a una planta o una parte de planta,
- (ii) determinar el perfil de expresión en ARNm de una combinación de genes diana en una muestra extraída a partir de la planta o de dicha parte de planta, por medio del dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 9.
- 10 (iii) comparar el perfil de expresión en ARNm obtenido en la etapa (ii) con un perfil de expresión en ARNm de referencia, para determinar o evaluar el estado de estimulación de las defensas naturales en dicha muestra,
- (iv) seleccionar positivamente dicha planta o dicha parte de planta si la comparación de la etapa (iii) muestra que dicha planta o dicha parte de planta posee un estado de estimulación de las defensas naturales susceptible de conferirles una resistencia mejorada a por lo menos un estrés biótico y/o abiótico de interés.
- 15 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, caracterizado por que la o las plantas pertenecen a la familia de las *Rosaceae*.

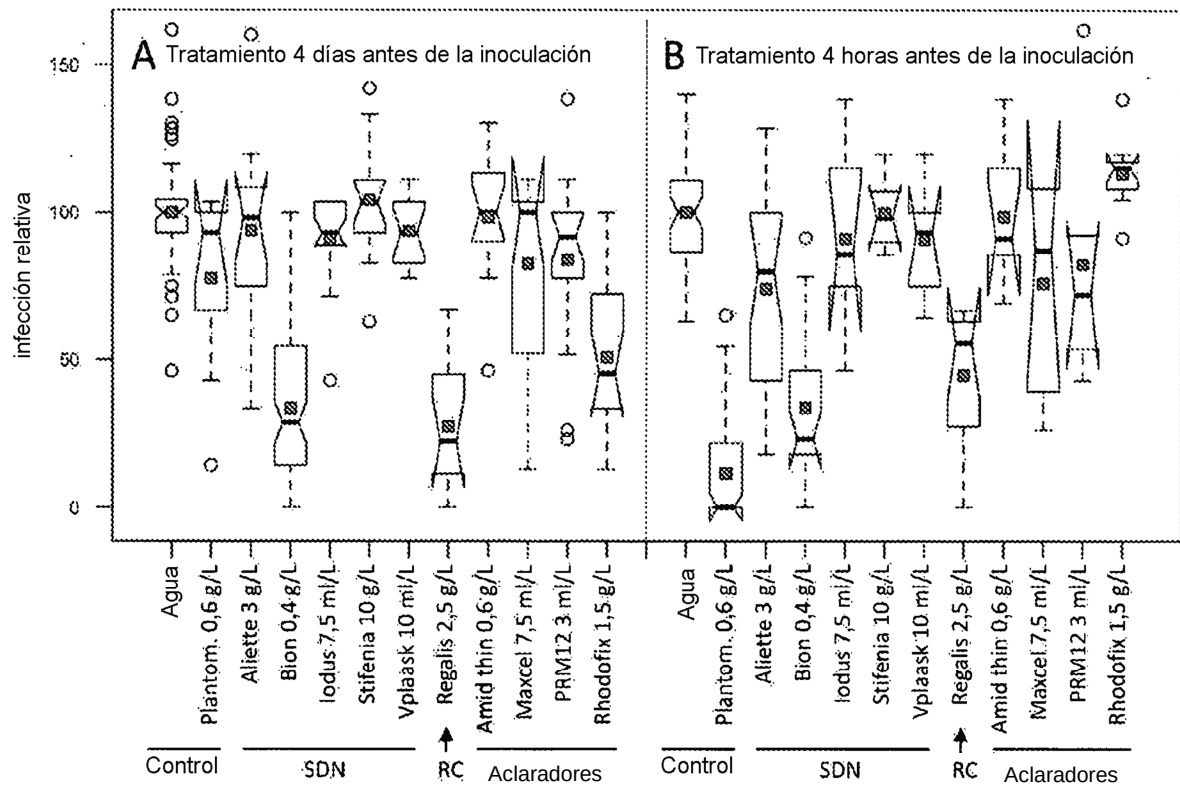


Figura 1

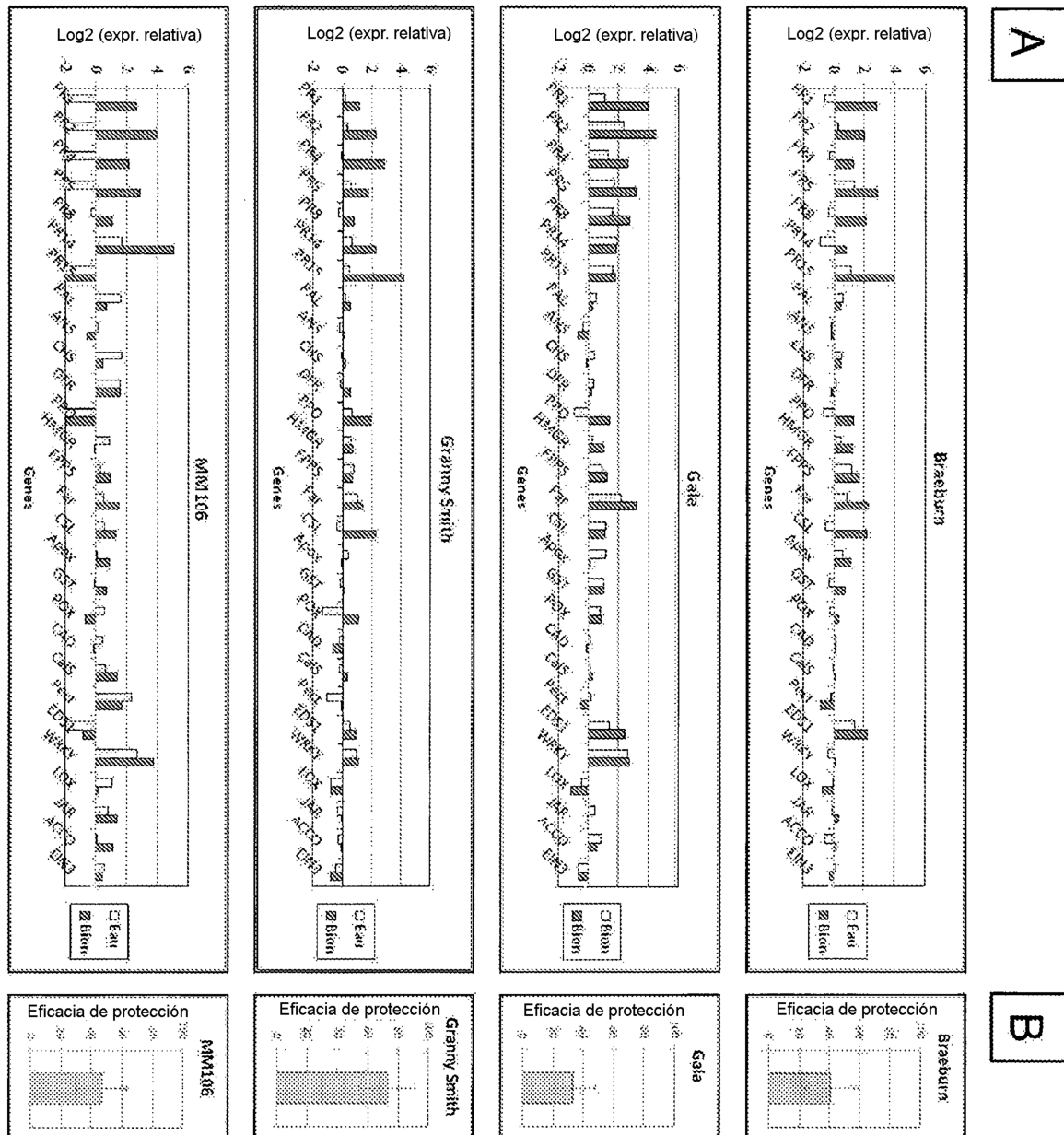


Figura 2