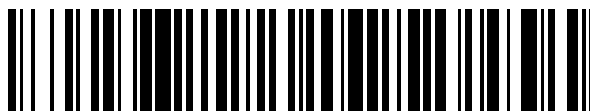


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 124**

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2013 PCT/EP2013/072083**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14064111**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2013 E 13780350 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2911517**

54 Título: **Nuevo extracto fúngico inmunogénico y receptor de reconocimiento de patrones en plantas**

30 Prioridad:

23.10.2012 GB 201219017

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

14.11.2019

73 Titular/es:

**EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN
(100.0%)
Geschwister-Scholl-Platz
72074 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**GUST, ANDREA;
BRUNNER, FRÉDÉRIC;
FRAITURE, MALOU y
ZHANG, WEIGUO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 731 124 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

Nuevo extracto fúngico inmunogénico y receptor de reconocimiento de patrones en plantas.

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere a un extracto fúngico purificado (SsEI) que provoca respuestas inmunes en plantas, y la invención se refiere a la identificación del receptor de plantas AtRLP30 que media el reconocimiento de SsEI. Además, se proporciona el uso de AtRLP30 en plantas para modular la respuesta inmune de las plantas contra las infecciones fúngicas con *Sclerotinia spp.*

Descripción

10 El modelo actual del sistema inmune de la planta apoya la existencia de dos ramas. Una rama se basa en la percepción de los patrones moleculares asociados a patógenos altamente conservados (PAMP) por los receptores de reconocimiento de patrones localizados en la membrana (PRR) que dan como resultado la activación de vías de señalización intracelular que conducen al refuerzo de la pared celular y la producción de compuestos antimicrobianos. Los PAMP son, por definición, moléculas indispensables que son características de toda una clase de microbios y, por lo tanto, son difíciles de mutar o eliminar sin causar una severa penalización para la aptitud del microbio. Los PAMP también se conocen como patrones moleculares asociados a microbios (MAMP), ya que no están restringidos solo a microbios patógenos. Un ejemplo bien conocido es Pep-13, un epítipo antigénico expuesto en la superficie dentro de una transglutaminasa de pared celular dependiente de calcio que se distribuye ampliamente en oomicetos patógenos que pertenecen al orden de los *Perenosporales* pero también están presentes en las bacterias *Vibrio* marinas. Pep-13 activa la defensa en el perejil y la patata, lo que sugiere su función como un determinante de reconocimiento específico del género para la activación de la inmunidad de la planta tanto en las plantas huésped como no huésped.

25 Más recientemente, el peptidoglicano bacteriano fue identificado como PAMP/MAMP novedoso que desencadena respuestas inmunes en *Arabidopsis thaliana*. El tratamiento con peptidoglicano induce flujos iónicos, el aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , la producción de especies reactivas de oxígeno y la fitoalexina camalexina. Los experimentos de perfiles de transcritos revelaron que el peptidoglicano afecta la expresión de muchos genes y que la reprogramación del transcriptoma de *Arabidopsis* se superpone bien con los cambios inducidos por el péptido flg22 derivado de flagelina, un PAMP/MAMP genuino. Un enfoque genético inverso identificó el motivo de lisina que contiene las proteínas de tipo receptor (RLP) LYM1 y LYM3 como receptores de peptidoglicanos que, además, requieren la acción de una tercera proteína LysM, la LysM-RLK CERK1.

30 Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en la superficie celular de la planta reconocen los MAMP y transducen la señal hacia la célula. Hasta ahora, se han identificado varios receptores pertenecientes a la familia de quinasas similares a receptores de repetición (LRR-RLK) y proteínas (LRR-RLP) ricas en leucina y a las LysM-RLK/RLP. El receptor de PAMP/MAMP mejor estudiado en plantas es FLS2, una proteína quinasa similar a un receptor de *Arabidopsis* con un dominio de repetición rico en leucina extracelular (LRR-RLK) que detecta y se une a flg22, un fragmento de 22 aminoácidos de la flagelina bacteriana. Los ortólogos de FLS2 están presentes en el tomate, el tabaco, la cebada y el arroz, lo que sugiere que la percepción de la flagelina es un mecanismo evolutivamente antiguo de detección de patógenos. Es importante destacar que las líneas de ADN-T de *Arabidopsis* con un FLS2 no funcional son más susceptibles a las infecciones causadas por bacterias patógenas como Pto DC3000. Estudios recientes han demostrado que FLS2 forma un complejo con BAK1, otro miembro de la familia LRR-RLK de una manera dependiente de flg22. Curiosamente, BAK1 se identificó inicialmente como un interactor de BRI1, un LRR-RLK que reconoce la hormona vegetal brassinólida involucrada en el control del crecimiento y el desarrollo. La acción de BAK1 es necesaria para la respuesta a varios PAMP/MAMP, incluyendo flg22 y el factor de alargamiento bacteriano EF-Tu en *Arabidopsis*, o la proteína bacteriana de choque frío y la elicitorina de oomicetos INFI en el tabaco. El mecanismo molecular subyacente a la activación del receptor involucra cambios conformacionales inducidos por ligandos dentro del complejo receptor, seguidos por eventos de auto- y transfosforilación en el dominio de la quinasa de los socios que interactúan y desencadenan la señalización corriente abajo. Aunque diferentes PAMP/MAMP son percibidos por diferentes receptores, inducen eventos comunes de señalización temprana, que incluyen mayores niveles de calcio citoplásmico, activación de MAP quinasa, producción de especies reactivas de oxígeno e inducción de la biosíntesis de ácido salicílico, jasmonato y etileno en plantas *Arabidopsis*.

Es importante destacar que el cebado biológico utilizando PAMP/MAMP proporciona medios para activar las defensas de las plantas de una manera no transgénica y ya se comercializa para el fortalecimiento de la salud de las plantas en la agricultura.

55 Wang et al. (Plant Physiology, junio de 2008, vol. 147 pág. 503-517) describen una selección de la función de las proteínas de tipo receptor en la inmunidad de las plantas utilizando una biblioteca de mutantes de inserción de ADN-T de *Arabidopsis*.

En vista de lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos PAMP/MAMP en plantas y sus respectivos receptores, que permiten aumentar la resistencia de las plantas, específicamente a infecciones con

patógenos fúngicos de la familia *Sclerotiniaceae*.

El problema anterior se resuelve mediante la invención definida por el pliego de reivindicaciones adjuntas.

En este documento, se divulga un extracto fúngico inmunogénico de planta, que puede obtenerse mediante un proceso que comprende las etapas de

- 5 (a) proporcionar un filtrado de cultivo de células de *Sclerotinia sclerotiorum*,
- (b) agregar dicho filtrado de (a) a una primera columna de intercambio catiónico equilibrada con un tampón A bajo en sal,
- (c) eluir el extracto con un tampón B alto en sal,
- 10 (d) diluir la fracción eluida de (c) con tampón A para permitir una unión con una segunda columna de intercambio catiónico,
- (e) agregar la fracción diluida de (d) a una segunda columna de intercambio catiónico y eluir el extracto fúngico inmunogénico de planta usando un tampón con una conductividad salina de entre 5 y 20 mS/cm, preferiblemente de entre 8 y 16 mS/cm.

15 También se divulga un procedimiento para obtener un extracto fúngico inmunogénico que comprende las etapas de (a) proporcionar un filtrado de cultivo de células de *Sclerotinia sclerotiorum*, (b) agregar dicho filtrado de (a) a una primera columna de intercambio catiónico equilibrada con un tampón A bajo en sal, (c) eluir el extracto con un tampón B alto en sal, (d) diluir la fracción eluida de (c) con tampón A para permitir una unión con una segunda columna de intercambio catiónico, (e) agregar la fracción diluida de (d) a una segunda columna de intercambio catiónico, y eluir el extracto fúngico inmunogénico de planta usando un tampón con una conductividad salina de entre 5 y 20 mS/cm, preferiblemente de entre 8 y 16 mS/cm.

25 El filtrado de cultivo provisto en la etapa (a) del procedimiento anterior puede prepararse filtrando el medio de cultivo de un cultivo de *Sclerotinia sclerotiorum* (aproximadamente 2 a 3 semanas de edad) a través de una malla de nylon, y posteriormente liofilizando el medio durante 3 a 4 días. El material liofilizado se resuspende luego en tampón A (aproximadamente 6 ml/g de peso seco) y se centrifuga para eliminar partículas insolubles. El sobrenadante se usa luego como filtrado de cultivo en el procedimiento de la presente invención. Además, la presente invención abarca otros procedimientos para proporcionar un filtrado de cultivo fúngico conocido por el experto en la materia.

30 Para el extracto fúngico inmunogénico de planta y el procedimiento para producir el mismo de acuerdo con la divulgación, se prefiere que el tampón A sea un tampón Mes de 100 mM a pH 5,4, y/o que el tampón B sea un tampón Mes de 100 mM a pH 5,4, 0,5 M de KCl. Mes es el nombre común para el compuesto ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico. El tampón de Mes se prepara de acuerdo con procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica.

35 Más preferido es el extracto fúngico inmunógeno de planta anterior y el procedimiento para producir el mismo, en el que dicha primera columna de intercambio catiónico tiene una matriz GE Healthcare Sepharose SP™ FastFlow. Con máxima preferencia, dicha matriz se empaqueta en una columna GE Healthcare XK16 hasta un volumen de lecho final de aproximadamente 15 ml.

El filtrado de cultivo se puede agregar a dicha primera columna de intercambio catiónico a una tasa de flujo de 3 a 5 ml/min. Opcionalmente, la columna se lava con tampón A.

40 Preferiblemente, la elución en la etapa (c) se realiza con tampón B a una tasa de flujo de 3-5 ml/min. Aquí se prefiere que se recolecte una fracción única correspondiente al pico de elución monitoreado con OD_{280nm} y OD_{215nm}. Opcionalmente, la fracción eluida se puede probar en plantas, como *Arabidopsis thaliana*, para determinar la actividad inductora de etileno.

45 Alternativamente, el extracto de la divulgación puede probarse para determinar su actividad para provocar respuestas de defensa inducidas por PAMP típicas en plantas, tales como la activación de MAP quinasa postraducciona y la activación transcripcional de genes marcadores inmunes, por ejemplo, la proteína 1 relacionada con la patogénesis (PRI) o la quinasa 1 que responde a flagelina (FRK1). Sin embargo, la divulgación no debe entenderse como limitada a las pruebas que utilizan las reacciones de defensa mencionadas anteriormente. También se pueden controlar otras expresiones de genes inmunes o reacciones bioquímicas típicas de una infección por patógenos para probar el extracto de la invención en cuanto a su actividad.

50 En una realización preferente adicional, dicha segunda columna de intercambio catiónico es una columna GE Healthcare Source 15S 4.6/100 PE, que preferiblemente se equilibra de antemano con el tampón A. Se prefieren el extracto fúngico inmunogénico de planta y el procedimiento para producirlo, en el que, en la etapa (d), la fracción eluida se diluye aproximadamente 10 veces con tampón A.

En otra realización preferente, la fracción diluida obtenida en la etapa (d) se carga en la segunda columna de

intercambio catiónico a una tasa de flujo de 0,5 a 1,5 ml/min. Después de cargar la segunda columna de intercambio catiónico con la fracción diluida, la columna se lava preferiblemente con tampón A.

Para la etapa de elución final (e), se prefiere usar una tasa de flujo de 0,5 a 1 ml/min de dicho tampón de elución.

5 En una realización preferente, la elución se realiza utilizando un gradiente de sal lineal del tampón B (por ejemplo, 0 % al 60 % en 40 volúmenes de columna) y recolectando una serie de fracciones de 500 µl sobre este gradiente. Posteriormente, las fracciones que se eluyeron por una conductividad salina de entre 5 y 20 mS/cm, preferiblemente de entre 8 y 16 mS/cm, contienen el extracto de la invención. Alternativamente, todas las fracciones eluidas por una conductividad salina de entre 5 y 20 mS/cm, preferiblemente de entre 8 y 16 mS/cm, se combinan para obtener el extracto de la invención.

10 Después de la etapa (e), la fracción eluida, que constituye el extracto de la invención, puede probarse opcionalmente para determinar la actividad inductora de etileno, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos descritos en los ejemplos de la presente invención.

En el contexto de la presente divulgación, se prefiere que los procedimientos de cromatografía se realicen en un sistema GE Healthcare AKTA Explorer FPLC enfriado a 4 °C y guiado por el software GE Healthcare Unicorn.

15 El extracto fúngico inmunogénico de la divulgación puede comprender al menos una de las proteínas seleccionadas de entre el citocromo C (A7E6R4), la N-acetiltransferasa (A7F941), el inhibidor de la disociación Rho-GDP (A7ET57), la poliubiquitina (A7E4E9), la proteína disulfuro isomerasa (A7EDH2) o pectina esterasa (A7EXV0). Aún más preferido es que dicho extracto fúngico comprenda al menos dos de dichas proteínas mencionadas con anterioridad, preferiblemente al menos tres de dichas proteínas, y con máxima preferencia, todas dichas proteínas. Los números de acceso entre paréntesis son entradas de UniProtKB/TrEMBL.

20 La divulgación proporciona, además, un extracto fúngico inmunogénico que comprende al menos una de las proteínas seleccionadas de entre citocromo C (A7E6R4), N-acetiltransferasa (A7F941), el inhibidor de la disociación de Rho-GDP (A7ET57), poliubiquitina (A7E4E9), proteína disulfuro isomerasa (A7EDH2) o pectina esterasa (A7EXV0). Aún más preferido es que dicho extracto fúngico comprenda al menos dos de dichas proteínas mencionadas con anterioridad, preferiblemente al menos tres de dichas proteínas, y con máxima preferencia, todas dichas proteínas.

Los extractos fúngicos inmunogénicos de la divulgación se usan en un aspecto en la activación, mejora o cebado de una respuesta inmune en una planta.

30 La divulgación proporciona, además, el uso de una proteína aislada seleccionada del citocromo C (A7E6R4), N-acetiltransferasa (A7F941), inhibidor de la disociación del Rho-GDP (A7ET57), poliubiquitina (A7E4E9), disulfuro de proteína isomerasa (A7EDH2) o pectina esterasa (A7EXV0), o un fragmento activo o homólogo de las mismas, para la activación, potenciación o cebado de una respuesta inmune en una planta.

35 Una proteína homóloga en el contexto de la presente invención denotará una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o, preferiblemente, el 99 % de identidad de secuencia con una de las proteínas seleccionadas de citocromo C (A7E6R4), N-acetiltransferasa (A7F941), inhibidor de la disociación de Rho-GDP (A7ET57), poliubiquitina (A7E4E9), proteína disulfuro isomerasa (A7EDF12) o pectina esterasa (A7EXV0). De acuerdo con la presente invención, los fragmentos activos de estas proteínas u homólogos de las mismas son partes de las proteínas que tienen la actividad de inducir una respuesta inmune en una planta contra una infección fúngica, preferiblemente contra una infección por *Sclerotiniaceae*, tal como una infección de una planta con *Sclerotinia sclerotiorum* o *Botrytis cinerea*.

40 Por lo tanto, un aspecto adicional de la divulgación también se relaciona con el uso de un ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada del Citocromo C (A7E6R4), N-acetiltransferasa (A7F941), inhibidor de la disociación del Rho-GDP (A7ET57), Polubiquitina (A7E4E9), proteína disulfuro isomerasa (A7EDF12) o pectina esterasa (A7EXV0), o un fragmento activo u homólogo de las mismas, para la activación, mejora o cebado de una respuesta inmune en una planta.

45 Un ácido nucleico homólogo en el contexto de la presente invención denotará un ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico con el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o preferiblemente el 99 % de identidad de secuencia con uno de los ácidos nucleicos que codifican para una proteína seleccionada del Citocromo C (A7E6R4), N-acetil-transferasa (A7F941), inhibidor de la disociación de Rho-GDP (A7ET57), poliubiquitina (A7E4E9), proteína disulfuro isomerasa (A7EDF12) o pectina esterasa (A7EXV0). Según la presente invención, los fragmentos activos de estas proteínas u homólogos de las mismas son partes de las proteínas que tienen la actividad de inducir una respuesta inmune en una planta contra una infección por hongos, preferiblemente contra una infección por *Sclerotiniaceae*, como una infección de una planta con *Sclerotinia sclerotiorum* o *Botrytis cinerea*.

55 La invención se refiere a un procedimiento para modular la resistencia de una planta a una infección fúngica por *Sclerotiniaceae*, que comprende, al modular en dicha planta la expresión de una proteína que comprende una

5 secuencia de aminoácidos de al menos el 60 % de identidad con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, en el que la modulación de la resistencia de una planta constituye un aumento o una disminución de la resistencia de una planta, en el que un aumento de la expresión de dicha proteína da como resultado el aumento de la resistencia de dicha planta a una infección por patógenos, y en el que la disminución de la expresión da como resultado una

10 En algunas realizaciones de la invención, la “modulación de la resistencia de una planta a una infección por patógeno” constituye un aumento o una disminución de la resistencia de una planta. Por otro lado, “la modulación en dicha planta de la expresión de una proteína” denota un aumento del producto de proteína expresado en dicha planta en comparación con una planta de control no tratada, o una disminución del producto de proteína expresada en dicha planta en comparación con una planta de control no tratada. Alternativamente, no se modula la expresión de dicha proteína, sino la actividad de la proteína. A este respecto, la modulación de la actividad de una proteína significa un aumento o una disminución de la función bioquímica/biológica de dicha proteína. Dicha modulación de la actividad se puede inducir, por ejemplo, introduciendo en una planta una proteína mutada que muestra características bioquímicas alteradas en comparación con la proteína de tipo salvaje.

15 En este aspecto, un aumento de la expresión/actividad de dicha proteína de la invención resulta en el aumento de la resistencia de dicha planta a una infección por patógenos. La disminución de la expresión/actividad resulta en una disminución de la resistencia de dicha planta a una infección por patógenos.

20 Además, se encontró sorprendentemente que la señalización a través de AtRLP30 además está complementada por quinasa 1 asociada a la proteína BRI1 correceptora (BAK1). Por lo tanto, un procedimiento preferido de la invención también comprende, además de la modulación de AtRLP30 o sus homólogos, modular en dicha planta la expresión de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de BAK1, en el que un aumento de la expresión de dicha proteína resulta en el aumento de la resistencia de dicha planta a una infección por patógenos, y en el que la disminución de la expresión da como resultado una disminución de la resistencia de dicha planta a una

25 infección por patógenos. Por lo tanto, para los procedimientos de la presente invención, la modulación de la expresión o actividad tanto de BAK1 como de AtRLP30 o sus homólogos permite una modulación incluso mejorada de la respuesta inmune de una planta, específicamente una respuesta inmune contra una infección fúngica.

En el contexto de la invención, la BAK1 preferida es la proteína BAK1 de *Arabidopsis thaliana*.

30 En realizaciones preferentes de la invención, la expresión de dicha proteína como se divulga anteriormente en dicha planta se incrementa por la expresión ectópica de dicha proteína. Por otro lado, la expresión de dicha proteína en dicha planta disminuye, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida, interferencia de ARN o metilación de ADN mediada por ARN.

35 Los mecanismos de silenciamiento mediados por ARN pueden interferir con la expresión génica a diferentes niveles: algunos mecanismos dirigidos por ARN actúan a nivel postranscripcional a través de la degradación de los ARN mensajeros dirigidos. Sin embargo, las especies derivadas de ARNdc también pueden dirigir cambios en la estructura de la cromatina de las regiones de ADN con las que comparten la identidad de secuencia. Por ejemplo, las plantas utilizan dichas especies de ARN para establecer huellas de metilación de citosina en secuencias de ADN idénticas, lo que proporciona una marca fundamental para la formación de heterocromatina transcripcionalmente silenciosa. Este proceso generalmente se conoce como metilación de ADN dirigida por ARN (RdDM).

40 RdDM se inicia por la presencia de moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc) en el núcleo celular. Potencialmente activan la metilación de novo de todas las bases de citosina que se encuentran en regiones de ADN complementarias a la secuencia de la doble cadena de ARN. Como consecuencia, en los mamíferos y en las plantas, las posiciones del ADN metilado sirven como indicadores para la remodelación de la cromatina circundante, de modo que se puede formar heterocromatina densa en estos loci. Debido al entorno denso de la cromatina, otras

45 proteínas tienen prohibido el contacto con el ADN. En particular, los factores de transcripción o los componentes de la maquinaria de transcripción no pueden reunirse en las secuencias del promotor metilado y, por lo tanto, no puede producirse transcripción en estas regiones. En efecto, los genes que tienen secuencias reguladoras metiladas se transcriben menos y, por lo tanto, se expresan menos.

50 Preferiblemente, la modulación de la expresión de AtRLP30 y/o BAK1, o sus homólogos de la invención, se realiza mediante la metilación del ADN mediada por ARN que se dirige a una secuencia seleccionada, pero no se limita a una secuencia reguladora endógena que regula la transcripción del ADN de la planta. Como se usa en el presente documento, la expresión “secuencia reguladora” significa una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente a una región codificante de un gen, afecta a la transcripción de la región codificante, de modo que una molécula de ácido ribonucleico (ARN) se transcribe desde la región codificante. Un elemento regulador

55 generalmente puede aumentar o disminuir la cantidad de transcripción de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, una secuencia de codificación, unida operativamente al elemento con respecto al nivel en el cual la secuencia de nucleótidos se transcribiría sin el elemento regulador. Los elementos reguladores son bien conocidos en la técnica y preferiblemente incluyen promotores, potenciadores, silenciadores, secuencias de intrones de silenciadores inactivos, secuencias 3'-no traducidas o 5'-no traducidas de secuencias transcritas, preferiblemente

una secuencia señal poli-A u otra proteína o elementos estabilizadores de ARN, aisladores que restringen el efecto regulador de estas secuencias a regiones definidas u otros elementos de control de la expresión génica que se sabe que regulan la expresión génica o la cantidad de expresión de un producto génico. Un elemento regulador puede aislarse de una secuencia de ADN genómico natural o puede ser sintético, por ejemplo, un promotor sintético.

5 Las expresiones “polinucleótido”, “oligonucleótido” y “secuencia de ácido nucleico” se usan indistintamente en el contexto de la presente invención para referirse a una forma polimérica (dos o más monómeros) de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Aunque los nucleótidos generalmente están unidos por enlaces fosfodiéster, el término también incluye polímeros que contienen enlaces de la cadena de amida neutros compuestos por unidades de aminoetilglicina. Los términos se usan solo para referirse a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, el término incluye moléculas de ADN bicatenarias y monocatenarias como antes. Se reconocerá que tales polinucleótidos pueden modificarse, por ejemplo, al incluir una marca como una marca radiactiva, fluorescente u otra, por metilación, mediante la inclusión de una estructura de tapa, al contener una sustitución de uno o más de los nucleótidos que ocurren con un análogo de nucleótido, al contener una modificación de internucleótido como enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, o similares), al contener un resto pendiente como una proteína (por ejemplo, una nucleasa, toxina, anticuerpo, péptido señal, poli-L-lisina, o similar), al contener un intercalador como acridina o psoraleno, por contener un quelante, que puede ser un metal como el boro, un metal oxidativo o un metal radiactivo, al contener un alquilador, o al tener un enlace modificado (por ejemplo, un ácido nucleico anomérico alfa).

20 Las especies de polinucleótidos preferidas de acuerdo con la presente invención se seleccionan de ADNss, ADNdc, ADNt, ARNss, ARNdc, ARNsh, ARNsi y ARNm. Preferiblemente, el polinucleótido es un ADN que codifica una molécula de ARNdc, preferiblemente una horquilla de ARNdc. Las horquillas de ARNdc se generan preferiblemente mediante la expresión de un constructo de ADN que codifica secuencias de sentido contiguo y antisentido que están separadas por un espaciador. Tras la transcripción de tal constructo, la molécula de ARNcs generada forma una doble cadena por emparejamiento de bases de las secuencias sentido y antisentido.

25 Para la invención como se divulga en el presente documento, una infección por *Sclerotiniaceae* es preferiblemente una infección de una planta con *Sclerotinia sclerotiorum*.

Las plantas que se usan preferiblemente en el contexto de la presente invención, o que son dianas preferidas para los extractos inmunogénicos son maíz (*Zea mays*), Brassica sp. (por ejemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), alfalfa (*Medicago sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuete (*Rachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatas*), cassava (*Manihot esculenta*), café (*Coffea spp.*), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), cítricos (*Citrus spp.*), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), banano (*Musa spp.*), aguacate (*Persea edulis*), higo (*Ficus carica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), oliva (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum spp.*), avena, lenteja de agua (*Lemna*), cebada, tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (por ejemplo, *Lactuca sativa*), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), habas (*Phaseolus limensis*), guisantes (*Lathyrus spp.*) y miembros del género *Cucumis* como el pepino (*C. sativus*), melón (*C. cantalupensis*) y melón almizclado (*C. melo*). También se incluyen plantas ornamentales como azalea (*Rhododendron spp.*), hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibiscus (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa spp.*), tulipanes (*Tulipa spp.*), narcisos (*Narcissus spp.*), petunias (*Petunia hybrida*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), flor de Pascua (*Euphorbia pulcherrima*) y crisantemo. Las plantas ornamentales adicionales dentro del alcance de la invención incluyen Impatiens, Begonia, Pelargonium, Viola, Cyclamen, Verbena, Vinca, Tagetes, Primula, Saint Paulia, Agertum, Amaranthus, Antihirrhinum, Aquilegia, Cineraria, Clover, Cosmo, Cow-pea, Dahlia, Datura, Delphinium, Gerbera, Gladiolo, Gloxinia, Hippeastrum, Mesembryanthemum, Salpiglossos y Zinnia. Las coníferas que se pueden emplear en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, pinos como el pino rígido (*Pinus taeda*), pino antillano (*Pinus elliotii*), pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino torcido (*Pinus contorta*) y el pino de Monterrey (*Pinus radiata*), pino Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), cicuta occidental (*Tsugaultilane*), abeto de Sitka (*Picea glau-ca*); secoya (*Sequoia sempervirens*), abetos verdaderos como abeto plateado (*Abies amabilis*) y abeto balsámico (*Abies balsamea*), y cedros como el cedro rojo occidental (*Thuja plicata*) y cedro amarillo de Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*), de preferencia en las que la planta es susceptible a una infección con *Sclerotinia spp.* o *Botrytis spp.*

El problema de la presente invención se resuelve adicionalmente mediante un procedimiento para producir una planta transgénica que tiene una resistencia mejorada a una infección fúngica por *Sclerotiniaceae*, que comprende las etapas de (i) transformar una planta o célula vegetal con una secuencia de nucleótidos que codifica una AtRLP30 o proteína similar a AtRLP30 que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos el 60 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. En realizaciones preferentes de la invención, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AtRLP30 o similar a AtRLP30 que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 está comprendida en un vector de expresión que permite la expresión del polinucleótido en una planta.

En realizaciones preferentes de la invención, cualquiera de los procedimientos para la producción de plantas como

se describe en este documento no son procesos esencialmente biológicos. Más preferiblemente, los procedimientos para la producción de plantas como se describe en este documento no contienen o consisten en ninguna etapa de cruzar sexualmente los genomas completos de plantas y de seleccionar posteriormente plantas.

5 En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un gen, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AtRLP30 o similar a AtRLP30 (homólogo) que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

10 El término "gen", como se usa en el contexto de la invención, describe cualquier elemento de secuencia de ADN que se puede transcribir en ARN y que podría codificar un rasgo hereditario en un organismo. La mayoría de los genes son genes codificantes de proteínas, en los que la secuencia de nucleótidos del gen codifica la secuencia de aminoácidos del producto proteico. Sin embargo, otros genes podrían codificar ARN que no se traducen en proteínas, también llamados ARN no codificantes (ARNnc). Por ejemplo, los ARNanc se codifican para ARN de transferencia (ARNt), o los ARN estructurales asombran en complejos de proteínas grandes como el ribosoma (ARNr). Además, el término "gen" incluye regiones codificantes para especies de ARN no codificantes pequeños. Los genes de ARN no codificantes pequeños incluyen ARNasno, microARN, ARNasi y ARNpi y ARNanc largos que incluyen ejemplos como Xist y HOTAIR.

15 Otro aspecto más de la divulgación se refiere a un casete de expresión caracterizado porque el casete de expresión permite la expresión de un gen de acuerdo con la invención.

20 Un aspecto preferido adicional de la presente divulgación se refiere luego a un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, un gen o un casete de expresión de acuerdo con la presente invención. Un vector dentro del significado de la presente invención es una proteína o un ácido nucleico o una mezcla de los mismos que puede introducirse o introducir los polinucleótidos comprendidos en una célula. Se prefiere que las proteínas codificadas por el ácido nucleico introducido se expresen dentro de la célula tras la introducción del vector.

25 En una realización preferente, el vector de la presente divulgación comprende vectores recombinantes, plásmidos, fagémidos, fagos, cósmidos, virus, en particular, pero no limitados a vectores de amplicón derivados de virus, vectores basados en virus X de patata, vectores basados en virus de cascabel de tabaco, vectores basados en geminivirus tales como virus de la hoja de la col y vectores basados en el virus del mosaico de la tira de la cebada y vectores basados en virus de satélite (revisado en Curtin, S. J., Wang, M.-B., Watson, J. M., Roffey, P., Blanchard, C. L. and Waterhouse, P. M. (2007), capítulo 12, pág. 291-332 en "Rice Functional Genomics; Challenges, Progress and Prospects". Upadhyaya, Narayana M. (Ed.), ISBN: 978-0-387-48903-2), virosomas y partículas recubiertas de ácido nucleico, en particular esferas de oro.

30 La expresión "molécula de ácido nucleico recombinante" se refiere a un polinucleótido producido por intervención humana. Una molécula de ácido nucleico recombinante puede contener dos o más secuencias de nucleótidos que están unidas de manera tal que el producto no se encuentra en una célula en la naturaleza. En particular, las dos o más secuencias de nucleótidos pueden unirse operativamente y, por ejemplo, pueden codificar un polipéptido de fusión, o pueden comprender una secuencia de nucleótidos y un elemento regulador. Una molécula de ácido nucleico recombinante también puede basarse, pero diferente, en un polinucleótido de origen natural, por ejemplo, un polinucleótido que tiene uno o más cambios de nucleótido de manera que un primer codón, que normalmente se encuentra en el polinucleótido, se reemplaza con un codón degenerado que codifica el mismo aminoácido o un aminoácido conservativo, o de manera que se introduce una secuencia de interés en el polinucleótido, por ejemplo, un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción o un sitio de empalme, un promotor, un sitio de inicio de replicación de ADN, o similares.

35 Se prefiere un vector recombinante de acuerdo con la presente invención, que es un vector de expresión, que comprende opcionalmente uno o más genes por expresar. Preferiblemente, dicha expresión está dirigida por una secuencia (o secuencias) reguladora(s). Una secuencia reguladora puede aislarse de una secuencia de ADN genómico natural o puede ser sintética, por ejemplo, un promotor sintético.

40 Tales vectores de expresión de la presente divulgación se usan preferiblemente en aquellas realizaciones en las que la expresión de una proteína de la invención se incrementa con el fin de modular la resistencia de dicha planta transformada. Preferiblemente, la resistencia contra una infección patógena, más preferiblemente la infección con un patógeno fúngico como se describió aquí anteriormente.

45 Las secuencias reguladoras pueden ser secuencias reguladoras expresadas en forma constitutiva, que mantienen la expresión génica en un nivel relativo de actividad (nivel basal), o pueden ser secuencias reguladoras reguladas. La secuencia reguladora expresada de manera constitutiva puede expresarse en cualquier tipo de célula, o puede ser específica de tejido, que se expresa solo en tipos de células particulares, específicos de fase, que se expresa solo durante etapas particulares de desarrollo o crecimiento de una célula vegetal, o similares. Una secuencia reguladora tal como una secuencia reguladora específica de tejido o de fase o una secuencia reguladora inducible útil en la construcción de un polinucleótido recombinante o en la práctica de un procedimiento de la invención puede ser una secuencia reguladora que generalmente, en la naturaleza, se encuentra en un genoma vegetal. Sin embargo, la

secuencia reguladora también puede ser de un organismo distinto de una planta que incluye, por ejemplo, un virus de planta, un virus animal o una célula de un animal u otro organismo multicelular.

Una secuencia reguladora preferida útil para la expresión de polinucleótidos de la divulgación es un elemento promotor. Los promotores útiles incluyen, pero no se limitan a promotores constitutivos, inducibles, regulados temporalmente, regulados en el desarrollo, regulados espacialmente, regulados químicamente, sensibles al estrés, específicos de tejidos, virales y sintéticos. Se sabe que las secuencias promotoras son fuertes o débiles. Un promotor fuerte proporciona un alto nivel de expresión génica, mientras que un promotor débil proporciona un nivel muy bajo de expresión génica. Un promotor inducible es un promotor que proporciona la activación y desactivación de la expresión génica en respuesta a un agente agregado exógenamente, o a un estímulo ambiental o de desarrollo. Se puede inducir un promotor bacteriano a niveles variables de expresión génica dependiendo del nivel de galactósido de isotiopropilo añadido a las células bacterianas transformadas. Una secuencia promotora aislada que es un promotor fuerte para el ácido nucleico heterólogo es ventajosa porque proporciona un nivel suficiente de expresión génica para permitir una fácil detección y selección de células transformadas y proporciona un alto nivel de expresión génica cuando se desee.

La elección del promotor variará dependiendo de los requisitos temporales y espaciales para la expresión, y también dependiendo de la especie objetivo. En algunos casos, la expresión en múltiples tejidos es deseable. Mientras que en otros, es deseable la expresión específica de tejido, por ejemplo, específica de hoja, específica de semilla, específica de pétalo, específica de antera o específica de médula. Aunque se ha demostrado que muchos promotores de dicotiledóneas son operativos en monocotiledóneas, y viceversa, idealmente se seleccionan promotores de dicotiledóneas para expresión en dicotiledóneas y promotores monocotiledóneos para expresión en monocotiledóneas. Sin embargo, no hay restricción al origen o fuente de un promotor seleccionado. Es suficiente que los promotores sean operativos para impulsar la expresión de una secuencia de nucleótidos deseada en la célula particular.

Otras secuencias de las que se ha encontrado que mejoran la expresión génica en plantas transgénicas incluyen secuencias de intrones (por ejemplo, de Adh 1, bronce 1, actina 1, actina 2 (documento WO 00/760067), o intrón de sacarosa sintasa), señales de poliadenilación en la UTR principal 3' y secuencias líder virales (por ejemplo, de TMV, MCMV y AMV). Por ejemplo, se sabe que varias secuencias líderes no traducidas derivadas de virus mejoran la expresión. Específicamente, las secuencias líderes del virus del mosaico del tabaco (TMV), el virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) y el virus del mosaico de la alfalfa (AMV) han demostrado ser eficaces para mejorar la expresión (por ejemplo, Gallie et al. 1987; Skuzeski et al. 1990). Otros líderes conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a líderes de topicornavirus, por ejemplo, líder de EMCV (región 5' no codificadora del virus de la encefalomiocarditis; Elroy-Stein et al., 1989); líderes de potyvirus, por ejemplo, líder de TEV (virus de ataque del tabaco); líder de MDMV (virus del mosaico enano del maíz); líder de la proteína de unión a la cadena pesada (BiP) de la inmunoglobulina humana (Macejaket al., 1991); líder no traducido del ARNm de la proteína de cubierta de AMV (AMV RNA 4; Jobling et al., 1987), TMV (Gallie et al., 1989) y MCMV (Lommel et al., 1991; véase también della Cioppa et al., 1987).

Para la expresión de cualquier constructo como se describe en el presente documento en una planta o célula vegetal, la invención preferiblemente enseña que los polinucleótidos descritos se pueden unir a un promotor y a un sitio de poliadenilación, en el que dicho promotor se caracteriza porque es funcional en dicha célula de dicha planta. Como promotor en este contexto, cualquier elemento de secuencia es suficiente para inducir la transcripción de la secuencia en sentido descendente. Los requisitos mínimos de los promotores son muy conocidos en la técnica y muchos de tales promotores se usan convencionalmente para la expresión génica en plantas.

En una realización preferente de la invención, la transformación de una planta o célula vegetal con cualquier polinucleótido como se describe en este documento, se realiza mediante un procedimiento seleccionado de procedimientos estándar conocidos en la técnica. La transformación del tejido vegetal se puede lograr preferiblemente mediante el bombardeo de partículas (Klein et al., "High-Velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic Acids Into Living Cells", Nature 327:70-73 (1987)), también conocida como transformación balística de la célula huésped, como se divulga en las patentes U. S. números 4.945.050, 5.036.006 y 5.100.792, todas de Sanford et al., y de Emershad et al. "Somatic Embryogenesis and Plant Development from Immature Zygotic Embryos of Seedless Grapes (*Vitis vinífera*)", Plant Cell Reports 14:6-12 (1995). En el bombardeo de partículas, se recubren micropartículas de tungsteno u oro (1 a 2 $\frac{1}{2}$ μ m de diámetro) con el ADN de interés y luego se bombardean en el tejido utilizando gas a alta presión. De esta manera, es posible administrar nucleótidos extraños en el núcleo. Las partículas biológicamente activas (por ejemplo, células bacterianas secas que contienen el vector y el ADN heterólogo) también pueden ser propulsadas en células vegetales. También se pueden usar otras variaciones de bombardeo de partículas, ahora conocidas o desarrolladas en lo sucesivo. Otro procedimiento preferido para introducir de manera estable el constructo de ácido nucleico en células vegetales es infectar una célula vegetal con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* previamente transformados con el constructo de polinucleótido. Como se describió anteriormente, el plásmido Ti (o Ri) de *Agrobacterium* permite la transferencia altamente exitosa de una molécula de ácido nucleico extraña a células vegetales. Una variación preferida de la transformación con *Agrobacterium* utiliza la infiltración al vacío en la que se usan plantas completas (Senior, "Uses of Plant Gene Silencing", Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 15:79-119 (1998)). Otro procedimiento de introducción referido es la fusión de protoplastos con otras entidades, ya sea con minicélulas, células, lisosomas u

otros cuerpos con superficie de lípidos fusibles (Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1859-63 (1982). También se prefiere en un procedimiento, en el que la molécula de ácido nucleico se introduce en las células vegetales mediante electroporación (Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5824 (1985)). En esta técnica, los protoplastos de plantas se someten a electroporación en presencia de plásmidos que contienen el casete de expresión. Los impulsos eléctricos de alta intensidad de campo permeabilizan en forma reversible las biomembranas permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos de plantas electroporadas reforman la pared celular, se dividen y se regeneran. Otros procedimientos preferidos de transformación incluyen la transformación química mediada por plantas, la microinyección, los abrasivos físicos, la transducción viral y los rayos láser (Senior, "Uses of Plant Gene Silencing", Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 15:79-119 (1998)). El procedimiento preciso de transformación no es crítico para la práctica de la presente invención. Cualquier procedimiento que resulte en una transformación eficaz de la célula huésped de elección es apropiado para practicar el presente documento.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de selección para patrones moleculares asociados a microbios (PAMP/MAMP), que comprende las etapas del procedimiento de (i) expresar en una planta o célula vegetal una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos el 60 % de identidad con la SEQ ID NO:1 (AtRLP30), (ii) poner en contacto dicha planta o célula vegetal con un compuesto candidato, (iii) medir la respuesta inmune de dicha planta o célula vegetal en comparación con una planta o célula vegetal de control, en el que una respuesta inmune elevada de dicha planta o célula vegetal indica que dicho compuesto candidato es un MAMP y en el que dicho MAMP es un patrón molecular fúngico presente en *Sclerotinia spp.* o *Botrytis ssp.*

Preferiblemente, en la etapa (iii) del procedimiento anterior de la invención, la respuesta inmune de dicha planta o célula vegetal se mide mediante la evaluación de la producción de etileno y/o la expresión de genes de respuesta inmune o genes informantes. Los genes informantes que se pueden utilizar en el presente contexto están compuestos por un promotor de respuesta inmune y está operativamente ligado a un gen informante que permite una fácil lectura de la expresión del gen informante, por ejemplo, enzimas de luciferasa o proteínas fluorescentes. El experto en la técnica tiene acceso a una amplia selección de enzimas que pueden usarse como genes informantes.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento para purificar un MAMP presente en *Sclerotinia spp.* o *Botrytis ssp.*, que comprende el uso de una proteína AtRLP30, o partes extracelulares de la misma, que comprenden una secuencia de al menos el 60 % de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Por ejemplo, para purificar el MAMP, la proteína anterior se puede acoplar a un medio portador sólido, preferiblemente a una membrana o una perla, que luego permite la unión selectiva del MAMP a dicha proteína. Luego, un extracto crudo o purificado de un cultivo de células patógenas se pone en contacto con el medio portador acoplado a la proteína de la invención. Usando un lavado posterior y una etapa de elución final, se puede recuperar un MAMP que se une selectivamente a la proteína de la invención.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para sensibilizar una planta contra infecciones fúngicas, que comprende realizar en dicha planta un procedimiento de acuerdo con la invención como se describió en el presente documento con anterioridad.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras y secuencias adjuntas, sin embargo, sin limitarse a ellas. En las figuras y secuencias,

Figura 1: Respuesta de etileno de *Arabidopsis* a extractos de los principales patógenos de cultivos de hongos. Los pedazos de hojas de *Arabidopsis* se trataron con filtrado de cultivo o extracto de micelio soluble de ocho especies de hongos. Después de 3 horas, la producción de etileno se midió por cromatografía de gases. La intensidad de la respuesta a los extractos se indica mediante un código de color que va desde el blanco (producción similar al control no tratado) pasando por amarillo y naranja (producción baja a media) hasta rojo (producción alta).

Figura 2: Respuesta de etileno de *Arabidopsis* a la fracción que contiene SsE1 eluida de una columna de cromatografía de intercambio catiónico de sefarosa SP. Los trozos de hoja de *Arabidopsis* se trataron con 10 µl de la fracción unida a sefarosa SP que se eluyó con KCl 0,5 M (tampón B). Después de 3 horas, se midió la producción de etileno mediante cromatografía de gases. 10 µl de tampón A (50/100 mM de Mes, pH 5,4) y 10 µl de tampón B (50/100 mM de Mes pH 5,4, KCl 0,5 M) se usaron como controles negativos. Se usaron 10 µl sin diluir y filtrado de cultivo diluido 10x (filtrado crudo) como controles positivos para la producción de etileno. La fracción de sefarosa SP no unida no tiene actividad inductora de etileno (flujo continuo).

Figura 3: Respuesta de etileno de *Arabidopsis* a las fracciones que contienen SsE1 eluidas de una columna de cromatografía de intercambio catiónico Source 15S. Los pedazos de hojas de *Arabidopsis* se trataron con 15 µl de la fracción unida a Source 15S que se eluyó con un gradiente de KCl 0-0,5 M. Se recogieron muestras de 500 µl. Después de 3 horas, se midió la producción de etileno mediante cromatografía de gases. Se usaron 15 µl de tampón A (Mes 50/100 mM pH 5,4) y 15 µl de tampón B (Mes 50/100 mM pH 5,4, 0,5 M de KCl) como controles negativos. Se usaron 15 µl de filtrado de cultivo sin diluir (filtrado en bruto),

así como 15 µl de la fracción de sefarosa SP activa (elución de SP), tanto sin diluir como diluida 10 veces, como controles positivos para la producción de etileno. Las fracciones que contienen SsE1 (B7-D7) se eluyen a un valor de conductividad salina de entre 8 y 16 mS/cm.

5 **Figura 4:** La fracción SsE1 del inductor de *Sclerotinia sclerotiorum* genera una respuesta inmune en *Arabidopsis*. (A) Inmunotransferencia de MAPK activada con anticuerpo antifosfo p44/p42 en extractos de hojas de *Arabidopsis*. Las muestras de hojas se recogieron 10 minutos después de la infiltración con flg22 o SsE1. La tinción con Ponceau S Red sirvió como control de carga. (B) Actividad de GUS en plantas transgénicas de *Arabidopsis* pPR1::GUS. Las hojas se infiltraron con filtrado crudo de *Sclerotinia* (CF); fracción o tampón de SsE1 y se recogieron 24 horas después para tinción histoquímica de GUS (C) Perfiles transcripcionales de FRK1 mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Las hojas de *Arabidopsis* se infiltraron con flg22, CF, SsE1, tampón o agua y se recogieron 6 horas después del tratamiento. Los datos de expresión se normalizan a los niveles del transcripto de actina y se presentan como inducción de plegado en comparación con el control tratado con agua. Tampón A = 50 mM Mes pH 5,4; tampón B = Mes 50 mM pH 5,4, KCl 500 mM.

15 **Figura 5:** Respuesta de etileno a SsE1 en mutantes bak1 y diferentes ecotipos de *Arabidopsis*. Los discos de hojas de las plantas de *Arabidopsis* de 5 semanas de edad se trataron con flg22 500 nM o extractos parcialmente purificados de *Penicillium* (PEN) y *Sclerotinia sclerotiorum* (SsE1). Después de 3 horas de incubación, la producción de etileno se midió por cromatografía de gases. (A) Producción de etileno en *Arabidopsis* Col-0 y tres líneas de inserción de T-ADN bak1 diferentes (B) Producción de etileno en *Arabidopsis* Col-0 y cinco accesos insensibles a SsE1.

20 **Figura 6:** Respuesta de etileno a SsE1 en mutantes atrlp30. Tres líneas de inserción de ADN-T independientes para AtRLP30 se trataron con flg22, una preparación de inductor en bruto de *Penicillium* (PEN) y SsE1.

SEQ ID NO. 1 muestra la secuencia de aminoácidos de AtRLP30:

1 MIPSQNSFS GSVITLYFFL LGSLVLR TLA SSR LHYCRHD QRDALLEFKH
 51 EFPVSESKPS PSLSSWNKTS DCCFWEGVTC DDESGEVVSL DLSYVLLNNS
 101 LKPTSGLFKL QQLQNLTLS D CHLYGEVTSS LGNLSRLTHL DLSSNQLTGE
 151 VLASVSKLNQ LRDLLSENS FSGNIPTSFT NLTKLSSLDI SSNQFTLENF
 201 SFILPNLTS L SSLNVA SNHF KSTLPSDM SG LHNLKYFDVR ENSFVGTFPT
 251 SLFTIPSLQI VYLEGNQFMG PIKFGNISSS SRLWDLNLAD NKFDGPIPEY
 301 ISEIHS LVLV DLSHNNLVGP IPTSISKLVN LQHLSLSNNT LEGEVPGCLW
 351 GLMTVTL SHN SFNSFGKSSS GALDGESMQE LDLGSNSLGG PFPHWICKQR
 401 FLKYLDLSNN LFNGSIPPCL KNSTYWLKGL VLRNNSFSGF LPDVFVNASM
 451 LLSLDVSYNR LEGKLPKSLI NCTGMELLNV GSNIKDTFP SWLVSLPSLR
 501 VLILRSNAFY GS LYD HISF GFQHLRLIDI SQNGFSGTLS PLYFSNWREM
 551 VTSVLEENG S NIGTEDWYMG EKGPEF SHSN SMTMIYK GVE TDFLRIPYFF
 601 RAIDFSGNRF FGNIPESVGL LKELRLLNLS GNSFTSNIPQ SLANLTNLET
 651 LDLSRNQLSG HIPRDLGSL S FLSTMNF SHN LLEGPVPLGT QFQSQHCSTF
 701 MDNLRLYGLE KICGKAHAPS STPLESEEF S EPEEQVINWI AAAIAYGPGV
 751 FCGLVIGHIF FTAHKHEWFM EK FHRNKRRV VTTSAR

25 SEQ ID NO. 2 muestra la secuencia de ácido nucleico genómico de AtRLP30:

ATAACCTGTTACTTACAAAACAAACAAAATGATTCCAA-
 GCCAATCTAATTCCTTTTCTGGTAGTGTTATTACCTT-
 GTATTTCTTCCCTCCTGGGTTCCCTTGTTCTACGCACTCTT-
 GCTTCTTCTAGGCTTCACTATTGCCGCCATGACCAAAGGGATGCTCTTCTCGAG-
 TTCAAACACGAGTTTCCGGTAAGTGAATCGAAGCCAAGTCCATCGTTGAG-
 TTCATGGAACAAGACTAGTGATTGCTGTTTTTTGGGAGGGTGTCAC-
 GTGCGATGATGAATCTGGCGAGGTGGTTTCACTTGACCTTAG-
 TTATGTCCTTCTCAACAACCTCTTTGAAACCAACTAG-
 TGGTCTTTTCAAACCTCCAACAACCTCCAGAACCTGACTCTCAGTGATTGCCATCTC-
 TATGGAGAGGGTACTTCTTCACTAGGAAACCTTTCTCGTCTCACGCATCTTGAC-
 CTTTCGAGTAATCAGCTGACAGGTGAAGTTCTGGCTTCGGTCAGTAAGCTAAAC-
 CAACTTAGAGACCTTTTACTTTCCGAAAACAGTTTTAGTGGTAACATTCC-
 TACTTCATTTACCAATTTAACGAAGCTTTCTAGTTTAGACATCTCTAGCAATCAG-
 TTCACATTGGAAAATTTCTCTTTCATACTACCAAATTTAACCAGCTT-
 GTCCTCCTTAAACGTTGCCTCTAATCACTTTAAATCCACGCTTCCATCTGA-
 TATGAGTGGACTCCACAACCTTGAAATATTTTGATGTGCGTGAGAATTCATTT-
 GTCGGGACTTTTCTACATCCTTATTACGATTCCCTTCGTTACAAATTGTTTATTT-
 GGAAGGAAACCAGTTCATGGGACCTATAAAGTTTGG-
 GAATATATCTTCATCTTCTAGGCTTTGGGATCTAAACCTTGCTGA-
 TAACAAATTCGATGGGCCAATCCCTGAATATATATCTGAAATTCACAG-
 TCTCATAGTACTAGATCTTAGCCACAACAACCTTAGTTGGGCCAATCCCCACTTCTA-
 TATCAAAGTTGGTCAACCTTCAGCATCTTAGTCTTTCAAACAATACCTT-
 GGAAGGCGAAGTGCCAGGTGCTTATGGGGATTGATGACAGTGACAC-
 TTTCCACAATTTCTTCAACAGTTTTGGAAAGTCATCATCCGGAGCTTT-
 GGATGGAGAATCAATGCAGGAGTTGGATCTTGGTTTCGAATTCACTTGGAGGAC-
 CTTTTCCCCATTGGATCTGCAAGCAAAGGTTCTTAAAGTACTTAGACTT-
 GTCCAACAATCTCTTCAACGGCTCAATTCCTCCTTGTTTTGAAAAATTCCAC-
 TTATTGGCTTAAAGGGCTAGTTCTGCGTAACAACAGCTTCAGCGGAT-
 TTCTCCCAGACGATTTGTCAATGCTAGCATGTTATTATCACTTGACGTTAGC-
 TACAACCGGTTGGAGGGAAAACCTCCAAAATCCCTGATCAATTGCACTGG-
 TATGGAACCTTGAATGTGGGAAGCAACATAATCAAGGACAC-
 TTTTCCATCCTGGTTGGTTTCTTTGCCATCATTAC-

GTGTCCTCATCCTCAGATCTAATGCATTCTATGGGTCGTTATATTATGACCACATA-
TCTTTTGGGTTTCAACATTTGAGACTCATTGATATATCACAGAATGGCTTCAGTG-
GAACTTTGTCACCTTTATATTTCTCCAATTGGCGTGAGATGGTGACATCTGTCTTA-
GAAGAAAACGGCTCTAATATAGGTACAGAGGATTGGTACATGGGCGA-
GAAAGGGCCCCGAGTTCAGCCATAGTAATTCGATGACTATGATATATAAAGGAG-
TAGAAACGGACTTCTTGCGGATCCCATATTTCTTCAGAGCATTGACTTTTCTG-
GAAACAGATTTTTTGGGAATATACCTGAATCCGTTGGTTTGTGAAGGAATT-
GCGTCTTCTCAATTTGTCAGGTAACCTCATTACAAGCAATATCCCTCAGTCATTGG-
CAAATTTGACAAATCTTGAGACATTGGACCTATCCCGGAATCAGC-
TATCAGGTCACATCCCTCGAGATCTTGGTAGCCTCTCTTTTCTGTCGAC-
CATGAATTTCTCCATAACCTTCTCGAAGGTCCAGTTCCTACTAGGCACTCAG-
TTTCAAAGCCAACATTTGTTCTACATTCATGGACAACCTCAGACTCTACGGTCTT-
GAGAAAATCTGTGGAAAAGCTCATGCCCGAGTTCACACCACTAGAATCCGAG-
GAATTTTCGGAACCAGAAGAACAAGTGATTAAGTGGATAGCAGCGGAATAGCC-
TACGGACCTGGTGTGTTTTGTGGATTAGTTATTGGACATATCTTCTTTACTG-
CACACAAACACGAGTGGTTCATGGAAAAATTCCATCGAAAACAAGCGCAGAGTAG-
TCACCACAAGTGCTCGTTGAACACCATCACCTCTCACAATTTCTCTGAG-
TGATTGTGAAACGTATATGTTTGTATGATATCTGTCAGTT-
GTGTTATGCATAAACTCTTTGTCCTTGTAAATTTCTACTTTATGGTATTGTAA-
GAAACGGCTTTGGTGGTATCTGATCTTCTATATGTTGGGTTG

Ejemplos

Ejemplo 1: selección de patógenos fúngicos

5 Los principales patógenos fúngicos se seleccionaron en el contexto de la presente invención para detectar la presencia de desencadenantes de las respuestas de defensa típicas inducidas por PAMP en *Arabidopsis*. Los patógenos ensayados fueron *Ustilago maydis* (tizón de maíz); *Magnaporthe oryzae* (tizón del arroz); *Mycosphaerella graminicola* (STB en trigo); *Fusarium graminearum* (roya del trigo); *Cercospora beticola* (mancha de hoja de remolacha); *Sclerotinia sclerotiorum* (pudrición del tallo en soja y brassica); *Rhizopus oryzae* (desintegración poscosecha); *Rhizoctonia solani* (podredumbre en muchas plantas). Estos patógenos fueron seleccionados porque sus genomas fueron o están actualmente secuenciados.

10 Los inventores han probado sistemáticamente preparaciones crudas y semifraccionadas tanto de filtrado de cultivo como de micelio de hongos cultivados axénicamente por su capacidad para inducir la producción de etileno en trozos de hojas de *Arabidopsis*. Las actividades de inductor más fuertes en los bioensayos se detectaron en los extractos de micelio y en los filtrados de cultivo de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* y *Rhizopus oryzae* (Figura 1).

Ejemplo 2: Purificación del extracto fúngico inmunogénico

15 Los filtrados de cultivo se utilizaron por primera vez como la fuente de elicitor. En un enfoque de dos etapas que combina columnas de cromatografía de intercambio catiónico, la actividad presente en el filtrado de cultivo de *Sclerotinia sclerotiorum* se purificó en una única fracción que contiene elicitor, llamado SsEI (elicitor 1 de *Sclerotinia sclerotiorum*).

20 La cepa 1946 de *Sclerotinia sclerotiorum* se adquirió de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). El hongo se cultivó en un medio de agar malta-peptona (10 g de malta, 2,5 g de peptona, 15 g de agar/l) durante 3 días a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se inocularon de 20 a 25 matraces Erlenmeyer de 1 litro, que contenían 400 ml de medio líquido de malta-peptona (10 g de malta, 2,5 g de peptona) cada uno, con 2-3 tapones de agar. El hongo se cultivó durante 3 semanas a temperatura ambiente en la oscuridad sin agitar. El medio de cultivo se filtró a través de una malla de nylon y se liofilizó durante 3 a 4 días. El material liofilizado se resuspendió en tampón Mes 100 mM a pH 5,4 (alrededor de 6 ml/g de peso seco) y se centrifugó dos veces durante 20 minutos a 10.000 g y 4 °C para eliminar las partículas insolubles. El sobrenadante resultante se utilizó para el aislamiento de SsEI.

SsEI se purificó parcialmente a partir de un filtrado de cultivo concentrado mediante cromatografía de intercambio catiónico en un enfoque de dos etapas. La cromatografía se realizó en un sistema GE Healthcare FPLC ÄKTA Explorer, enfriado a 4 °C y guiado por el software GE Healthcare Unicorn. En una primera etapa, una columna GE Healthcare XK16 se empaquetó con la matriz GE Healthcare Sepharose SP FastFlow hasta un volumen de lecho de aproximadamente 15 ml. La columna se equilibró con tampón A (tampón Mes 100 mM a pH 5,4). El filtrado de cultivo concentrado se cargó luego a una tasa de flujo de 3 a 5 ml/min. La columna se lavó con tampón A y la elución se realizó con tampón B (tampón Mes 100 mM a pH 5,4, KCl 500 mM) a una velocidad de flujo de 3-5 ml/min. Una única fracción correspondiente al pico de elución monitoreado con OD_{280nm} y OD_{215nm} se recolectó manualmente y se analizó la actividad inductora de etileno (Figura 2). En una segunda etapa, el eluato total se diluyó 10x en el tampón A y se cargó a una tasa de flujo de 0,5 a 1,5 ml/min en una columna de GE Healthcare Source 15S 4,6/100 PE equilibrada con el tampón A. La columna se lavó con el tampón A. SsEI se eluyó a continuación con un gradiente lineal de tampón B (0 % al 60 % en 40 volúmenes de columna) a una tasa de flujo de 0,5 a 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 500 µl correspondientes a todo el pico de elución controlado con OD_{280nm} y OD_{215nm} utilizando el fraccionamiento automatizado. Las fracciones activas que contienen SsEI se identificaron mediante la medición de su capacidad para provocar la producción de etileno en las hojas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 (Figura 3).

Cuando se infiltró en hojas de *Arabidopsis*, SsEI fue capaz de inducir respuestas típicas de defensa inducidas por PAMP, tales como la activación de la MAP quinasa postraduccional y la activación transcripcional de los marcadores inmunitarios que codifican la proteína relacionada con la patogénesis (PR1) y la quinasa 1 que responde a flagelina (FRK1) (Figura 4A-C).

20 Ejemplo 3: Caracterización del extracto fúngico inmunogénico

Para caracterizar SsEI, las fracciones activas eluidas de Source 15S se agruparon y se sometieron a análisis de espectrometría de masas utilizando nano-LC MS/MS (B. Macek, Proteome Center Tübingen). Mediante este enfoque, se detectaron varias proteínas dentro de la muestra, que podrían ser responsables de la actividad inmunogénica de SsEI. Las proteínas se proporcionan en la Tabla 1.

25

Tabla 1:

ID de la proteína	Nombre de la proteína	Péptidos	Puntaje de Mascot	MW (kDa)	pI
A7E6R4	Citocromo C	10	370,22	12,0	4,3
A7F941	N-acitransferasa	9	363,95	19,3	5,7
A7ET57	Inhibidor de disociación de Rho-GDP	7	269,73	22,5	5,1
A7E4E9	Poliubiquitina	5	183,40	34,3	7,4
A7EDH2	Proteína disulfuro isomerasa	3	105,35	39,4	7,2
A7EXV0	Pectina esterasa	2	115,36	34,2	7,3

Ejemplo 4: Identificación del receptor SsEI

A fin de identificar el receptor de reconocimiento de patrones que media la respuesta inmune tras el tratamiento con el extracto inmunogénico fúngico de la invención, se realizó un análisis genético inverso para las proteínas receptoras que responden a SsEI en *Arabidopsis*. El creciente cuerpo de información estructural y funcional sobre los PRR de las plantas revela que existen principalmente dos tipos de receptores que median la detección de clases estructuralmente diferentes de patrones microbianos. Se piensa que las proteínas LRR y las quinasas receptoras LRR están implicadas en la activación inmune del huésped, preferiblemente a los patrones peptídicos, mientras que las proteínas del dominio LysM y las quinasas receptoras LysM parecen mediar en la detección microbiana y la inmunidad del huésped preferiblemente a través del reconocimiento de los patrones de los glicanos. En consecuencia, la clase de proteínas seleccionada se restringió a los miembros de la familia LRR-RLK que probablemente contendrán el receptor SsEI.

Para este fin, se seleccionó una colección de líneas de inserción de ADN-T homocigotas para 40 LRR-RLK inducidas por PAMP (B. Kemmerling, ZMBP Tübingen) para determinar la insensibilidad a SsEI. Además, los inventores obtuvieron y probaron mutantes simples, *fls2 efr cerkl* y cuádruples mutantes de *fls2 efr cerkl* y cada uno de los miembros de la subfamilia XII LRR-RLK que comprende el receptor flg22 FLS2 y el receptor EF-Tu EFR (C. Zipfel, Sainsbury laboratory Norwich, Reino Unido). Ninguna de las líneas de eliminación de LRR-RLK probadas mostró una reducción significativa en la producción de etileno cuando se trató con SsEI, excepto por la mutante bak1. Existen varios alelos mutantes de BAK1: los mutantes bak1-3 y bak1-4 están parcialmente alterados en la señalización de brasinoesteroides y en el control de la muerte celular, mientras que el alelo bak1-5 recién descrito

45

solo está alterado en la señalización de PAMP pero no afecta las respuestas de brasinoesteroides y la muerte celular. Si bien la respuesta en las plantas bak1-3 y bak1-4 no se eliminó por completo, las plantas bak1-5 fueron completamente insensibles al tratamiento con SsEI (Figura 5A).

- 5 En un enfoque paralelo, se probó la respuesta del etileno al tratamiento con SsEI en 60 accesos diferentes de *Arabidopsis* (Nordborg collection, Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre). La variación genética natural que existe entre diferentes ecotipos de *Arabidopsis* puede llevar a la identificación de ecotipos que son parcial o totalmente insensibles a SsEI. Tales ecotipos serían útiles para la identificación mediante clonación basada en mapas del lugar responsable de la percepción de SsEI. El mejor ejemplo para el empleo exitoso de este enfoque fue el de la identificación del ecotipo Ws-0 insensible a la flagelina que carece de un receptor FLS2 funcional. Cinco ecotipos (Mt-0, Lov-1, Br-0, Lov-5 y Sd-1) entre los 60 probados demostraron ser insensibles a SsEI. Estos ecotipos no se ven afectados por su capacidad para producir etileno, ya que conservaron la respuesta completa a flg22 o al inductor de PEN (Figura 3B). Los cruces de los ecotipos insensibles Mt-0, Lov-1 y Sd-1 y el análisis de las poblaciones F1 resultantes indicaron que el mismo gen o genes recesivos confieren respuestas a SsEI en los tres ecotipos (datos no mostrados).
- 10
- 15 La producción de etileno se utilizó como rasgo para un análisis genético de la sensibilidad hacia SsEI en los cruces de Lov-1 X Col-0. Por lo tanto, se encontró que un único locus recesivo que se mapea en la parte superior del brazo del cromosoma 3 es responsable de la sensibilidad al SsEI (64 de las 270 plantas F2 analizadas no eran sensibles al inductor). Un mapeo preciso adicional utilizando marcadores SSLP (Polimorfismo de longitud de secuencia simple) y diversos CAPS (secuencia polimórfica amplificada escindida) produjo una región que contiene cuatro proteínas similares a receptores de LRR (RLP) pero ningún miembro de las otras familias de proteínas que contienen LRR. Las líneas de eliminación de ADN-T independientes para cada uno de los candidatos de LRR-RLP se trataron con SsEI. Los resultados mostraron que AtRLP30 (At3g05360) está involucrado en el reconocimiento de SsEI, mientras que las respuestas a flg22 y PEN no se alteraron (Figura 6). Las líneas de eliminación directa correspondientes a los otros dos candidatos, AtRLP32 (At3g05650) y AtRLP33 (At3g05660), también respondieron normalmente a SsEI
- 20

25 **Listado de secuencias**

<110> Eberhard Karls Universitat Tübingen

<120> Nuevo extracto fúngico inmunogénico y receptor de reconocimiento de patrones en plantas

<130> U30444PCT

<150> GB1219017.9

<151> 2012 10 23

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 786

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

ES 2 731 124 T3

Met Ile Pro Ser Gln Ser Asn Ser Phe Ser Gly Ser Val Ile Thr Leu
 1 5 10 15

Tyr Phe Phe Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Arg Thr Leu Ala Ser Ser
 20 25 30

Arg Leu His Tyr Cys Arg His Asp Gln Arg Asp Ala Leu Leu Glu Phe
 35 40 45

Lys His Glu Phe Pro Val Ser Glu Ser Lys Pro Ser Pro Ser Leu Ser
 50 55 60

Ser Trp Asn Lys Thr Ser Asp Cys Cys Phe Trp Glu Gly Val Thr Cys
 65 70 75 80

Asp Asp Glu Ser Gly Glu Val Val Ser Leu Asp Leu Ser Tyr Val Leu
 85 90 95

Leu Asn Asn Ser Leu Lys Pro Thr Ser Gly Leu Phe Lys Leu Gln Gln
 100 105 110

Leu Gln Asn Leu Thr Leu Ser Asp Cys His Leu Tyr Gly Glu Val Thr
 115 120 125

Ser Ser Leu Gly Asn Leu Ser Arg Leu Thr His Leu Asp Leu Ser Ser
 130 135 140

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

ES 2 731 124 T3

Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ser Glu Asn Ser Phe Ser Gly Asn Ile Pro
 165 170 175
 Thr Ser Phe Thr Asn Leu Thr Lys Leu Ser Ser Leu Asp Ile Ser Ser
 180 185 190
 Asn Gln Phe Thr Leu Glu Asn Phe Ser Phe Ile Leu Pro Asn Leu Thr
 195 200 205
 Ser Leu Ser Ser Leu Asn Val Ala Ser Asn His Phe Lys Ser Thr Leu
 210 215 220
 Pro Ser Asp Met Ser Gly Leu His Asn Leu Lys Tyr Phe Asp Val Arg
 225 230 235 240
 Glu Asn Ser Phe Val Gly Thr Phe Pro Thr Ser Leu Phe Thr Ile Pro
 245 250 255
 Ser Leu Gln Ile Val Tyr Leu Glu Gly Asn Gln Phe Met Gly Pro Ile
 260 265 270
 Lys Phe Gly Asn Ile Ser Ser Ser Ser Arg Leu Trp Asp Leu Asn Leu
 275 280 285
 Ala Asp Asn Lys Phe Asp Gly Pro Ile Pro Glu Tyr Ile Ser Glu Ile
 290 295 300
 His Ser Leu Ile Val Leu Asp Leu Ser His Asn Asn Leu Val Gly Pro
 305 310 315 320
 Ile Pro Thr Ser Ile Ser Lys Leu Val Asn Leu Gln His Leu Ser Leu
 325 330 335
 Ser Asn Asn Thr Leu Glu Gly Glu Val Pro Gly Cys Leu Trp Gly Leu
 340 345 350
 Met Thr Val Thr Leu Ser His Asn Ser Phe Asn Ser Phe Gly Lys Ser
 355 360 365
 Ser Ser Gly Ala Leu Asp Gly Glu Ser Met Gln Glu Leu Asp Leu Gly
 370 375 380
 Ser Asn Ser Leu Gly Gly Pro Phe Pro His Trp Ile Cys Lys Gln Arg
 385 390 395 400
 Phe Leu Lys Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asn Leu Phe Asn Gly Ser Ile
 405 410 415

ES 2 731 124 T3

Pro Pro Cys Leu Lys Asn Ser Thr Tyr Trp Leu Lys Gly Leu Val Leu
 420 425 430
 Arg Asn Asn Ser Phe Ser Gly Phe Leu Pro Asp Val Phe Val Asn Ala
 435 440 445
 Ser Met Leu Leu Ser Leu Asp Val Ser Tyr Asn Arg Leu Glu Gly Lys
 450 455 460
 Leu Pro Lys Ser Leu Ile Asn Cys Thr Gly Met Glu Leu Leu Asn Val
 465 470 475 480
 Gly Ser Asn Ile Ile Lys Asp Thr Phe Pro Ser Trp Leu Val Ser Leu
 485 490 495
 Pro Ser Leu Arg Val Leu Ile Leu Arg Ser Asn Ala Phe Tyr Gly Ser
 500 505 510
 Leu Tyr Tyr Asp His Ile Ser Phe Gly Phe Gln His Leu Arg Leu Ile
 515 520 525
 Asp Ile Ser Gln Asn Gly Phe Ser Gly Thr Leu Ser Pro Leu Tyr Phe
 530 535 540
 Ser Asn Trp Arg Glu Met Val Thr Ser Val Leu Glu Glu Asn Gly Ser
 545 550 555 560
 Asn Ile Gly Thr Glu Asp Trp Tyr Met Gly Glu Lys Gly Pro Glu Phe
 565 570 575
 Ser His Ser Asn Ser Met Thr Met Ile Tyr Lys Gly Val Glu Thr Asp
 580 585 590
 Phe Leu Arg Ile Pro Tyr Phe Phe Arg Ala Ile Asp Phe Ser Gly Asn
 595 600 605
 Arg Phe Phe Gly Asn Ile Pro Glu Ser Val Gly Leu Leu Lys Glu Leu
 610 615 620
 Arg Leu Leu Asn Leu Ser Gly Asn Ser Phe Thr Ser Asn Ile Pro Gln
 625 630 635 640
 Ser Leu Ala Asn Leu Thr Asn Leu Glu Thr Leu Asp Leu Ser Arg Asn
 645 650 655
 Gln Leu Ser Gly His Ile Pro Arg Asp Leu Gly Ser Leu Ser Phe Leu
 660 665 670

ES 2 731 124 T3

Ser Thr Met Asn Phe Ser His Asn Leu Leu Glu Gly Pro Val Pro Leu
675 680 685

Gly Thr Gln Phe Gln Ser Gln His Cys Ser Thr Phe Met Asp Asn Leu
690 695 700

Arg Leu Tyr Gly Leu Glu Lys Ile Cys Gly Lys Ala His Ala Pro Ser
705 710 715 720

Ser Thr Pro Leu Glu Ser Glu Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Gln Val
725 730 735

Ile Asn Trp Ile Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Pro Gly Val Phe Cys
740 745 750

Gly Leu Val Ile Gly His Ile Phe Phe Thr Ala His Lys His Glu Trp
755 760 765

Phe Met Glu Lys Phe His Arg Asn Lys Arg Arg Val Val Thr Thr Ser
770 775 780

Ala Arg
785

- <210> 2
- <211> 2553
- <212> ADN
- <213> Arabidopsis thaliana

- <400> 2

ES 2 731 124 T3

ataacctggt	acttacaaaa	caaacaaaat	gattccaagc	caatctaatt	ccttttctgg	60
tagtgttatt	accttgatt	tcttcctcct	gggttcctt	gttctacgca	ctcttgcttc	120
ttctaggctt	cactattgcc	gccatgacca	aagggatgct	cttctcgagt	tcaaacacga	180
gtttccggta	agtgaatcga	agccaagtcc	atcgttgagt	tcatggaaca	agactagtga	240
ttgctgtttt	tgggaggtg	tcacgtgcga	tgatgaatct	ggcgaggtgg	tttcaactga	300
ccttagttat	gtccttctca	acaactcttt	gaaaccaact	agtggctctt	tcaaactcca	360
acaactccag	aacctgactc	tcagtgattg	ccatctctat	ggagaggta	cttcttcaact	420
aggaaacctt	tctcgtctca	cgcatcttga	cctttcgagt	aatcagctga	caggtgaagt	480
tctggcttcg	gtcagtaagc	taaaccaact	tagagacctt	ttactttccg	aaaacagttt	540
tagtggtaac	attcctactt	catttaccaa	tttaacgaag	ctttctagtt	tagacatctc	600
tagcaatcag	ttcacattgg	aaaatttctc	tttcatacta	ccaaatttaa	ccagcttgtc	660
ctccttaaac	gttgctctca	atcactttaa	atccacgctt	ccatctgata	tgagtggact	720

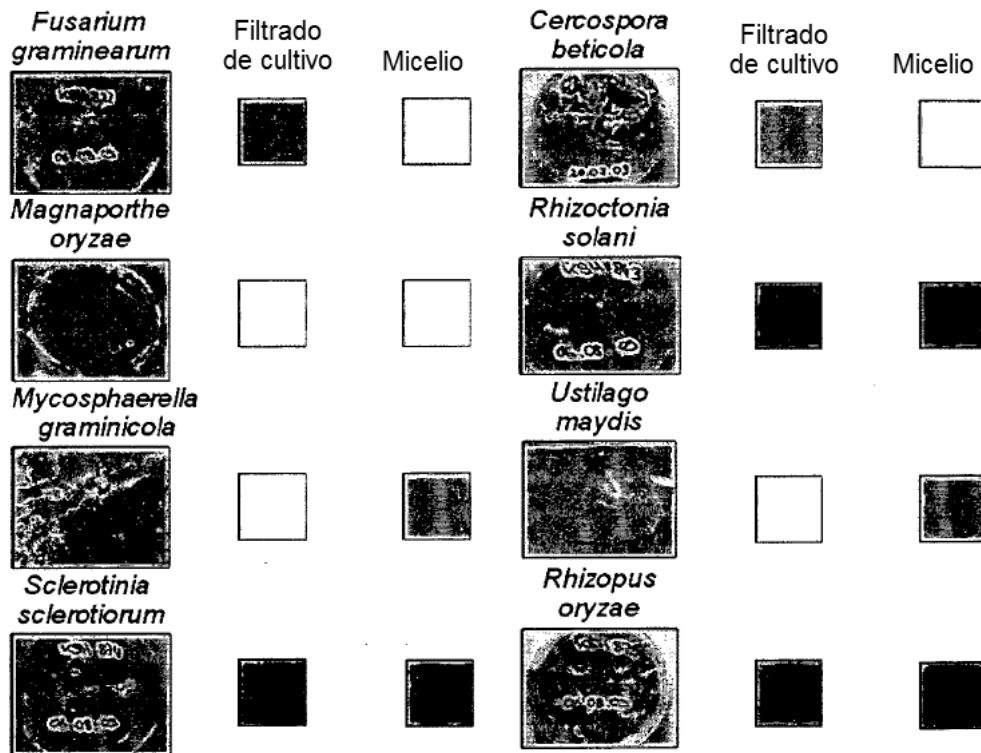
ES 2 731 124 T3

ccacaacttg aaatattttg atgtgcgtga gaattcattt gtogggactt ttctacatc 780
 cttattcaag attccttcgt tacaattgt ttatttggaa gaaaccagt tcatgggacc 840
 tataaagttt ggaatatac ctcatcttc taggctttgg gatctaaacc ttgtgataa 900
 caaattogat gggccaatcc ctgaatatac atctgaaatt cacagtctca tagtactaga 960
 tcttagccac aacaacttag ttgggccaat cccacttct atatcaaagt tggccaacct 1020
 tcagcatctt agtctttcaa acaatacctt ggaaggcgaa gtgccagggt gcttatgggg 1080
 attgatgaca gtgacacttt cccacaattc tttcaacagt tttggaaagt catcatccgg 1140
 agctttggat ggagaatcaa tgcaggaggt ggatcttggg togaattcac ttggaggacc 1200
 ttttccocat tggatctgca agcaaagggt cttaaagtac ttagacttgt ccaacaatct 1260
 cttcaaoggc tcaattcttc cttgtttgaa aaattccact tattggctta aagggctagt 1320
 tctgcgtaac aacagcttca gggatttct cccagacgta tttgtcaatg cttagcatgtt 1380
 attatcactt gacgttagct acaaccgggt ggagggaaaa ctccaaaat cctgatcaa 1440
 ttgcaactgg atggaacttc tgaatgtggg aagcaacata atcaaggaca cttttccatc 1500
 ctggttgggt tctttgccat cattacgtgt cctcatcttc agatctaagc cattctatgg 1560
 gtogttatat tatgaccaca tatcttttgg gtttcaacat ttgagactca ttgatatac 1620
 acagaatggc ttcagtggaa ctttgtcacc tttatattc tccaattggc gtgagatggt 1680
 gacatctgtc ttagaagaaa acggctctaa tataggtaaa gaggattggt acatggggca 1740
 gaaagggccc gagttcagcc atagtaattc gatgactatg atatataaag gtagtagaac 1800
 ggacttcttg cggatcccat atttcttcag agcattgact tttctggaaa cagatttttt 1860
 ggaatatac ctgaatccgt tggtttgggt aaggaattgc gtcttctcaa tttgtcaggt 1920
 aactcattca caagcaatat cctcagtc a ttggcaaatt tgacaaatct tgagacattg 1980
 gacctatccc ggaatcagct atcaggtcac atccctcgag atcttggtag cctctctttt 2040
 ctgtcgacca tgaatttctc ccataacctt ctogaaggtc cagttccact aggcactcag 2100
 tttcaaagcc aacattgttc tacattcatg gacaacctca gactctacgg tcttgagaaa 2160
 atctgtggaa aagctcatgc cccaggttct acaccaactag aatccgagga attttggaa 2220
 ccagaagaac aagtgattaa ctggatagca gggccaatag cctacggacc tgggtgtgtt 2280
 tgtggattag ttattggaca tatcttcttt actgcacaca aacacgagtg gtccatggaa 2340
 aaattccatc gaaacaagcg cagagtagtc accacaagtg ctogttgaac accatcacct 2400
 ctcaaatctt ctctgagtga ttgtgaaaag tatatgtttg ttatgatata tgtcagttgt 2460
 gttatgcata aactctttgt ctttgaatt tctacttta tggatttga agaaacggct 2520
 ttggtggtat ctgatcttct atatgttggg ttg 2553

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para modular la resistencia de una planta a una infección fúngica por *Sclerotiniaceae*, que comprende modular en dicha planta la expresión de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos el 60 % de identidad con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, en el que la modulación de la resistencia de una planta constituye un aumento o una disminución de la resistencia de una planta, en el que un aumento de la expresión de dicha proteína da como resultado el aumento de la resistencia de dicha planta a una infección fúngica por *Sclerotiniaceae* y en el que la disminución de la expresión da como resultado una disminución de la resistencia de dicha planta a una infección fúngica por *Sclerotiniaceae*.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, modular en dicha planta la expresión de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos el 60 % de identidad con BAK1, en el que un aumento de la expresión de dicha proteína da como resultado un aumento de la resistencia de dicha planta a una infección fúngica por *Sclerotiniaceae*, y en el que la disminución de la expresión da como resultado una disminución de la resistencia de dicha planta a una infección fúngica por *Sclerotiniaceae*.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la expresión de dicha proteína en dicha planta se incrementa por la expresión ectópica de dicha proteína.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la expresión de dicha proteína en dicha planta disminuye por mutagénesis, interferencia de ARN o metilación de ADN mediada por ARN.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha infección fúngica por *Sclerotiniaceae* es una infección de una planta con *Sclerotinia sclerotiorum* o *Botrytis cinerea*.
- 20 6. Un procedimiento para producir una planta transgénica que tiene una mayor resistencia a una infección fúngica por *Sclerotiniaceae*, que comprende las etapas de (i) transformar una planta o célula vegetal con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AtRLP30 o proteína similar a AtRLP30 que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos el 60 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.
- 25 7. Un procedimiento de selección de patrones moleculares asociados a microbios (PAMP/MAMP) presente en *Sclerotinia spp.* o *Botrytis ssp.*, que comprende las etapas del procedimiento de (i) expresar en una planta o célula vegetal una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos el 60 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 (AtRLP30), (ii) poner en contacto dicha planta o célula vegetal con un compuesto candidato, (iii) medir la respuesta inmune de dicha planta o célula vegetal en comparación con una planta o célula vegetal de control, en el que una respuesta inmune elevada de dicha planta o célula vegetal indica que dicho compuesto candidato es un MAMP presente en *Sclerotinia spp.* o *Botrytis ssp.*
- 30 8. Un procedimiento de selección de acuerdo con la reivindicación 7, en el que, en la etapa (iii), la respuesta inmune de dicha planta o célula vegetal se mide por medio de la evaluación de la producción de etileno y/o la expresión de genes que responden al sistema inmune o genes informantes.
- 35 9. Un procedimiento para purificar un MAMP presente en *Sclerotinia spp.* o *Botrytis ssp.*, que comprende el uso de una proteína AtRLP30, o partes extracelulares de la misma, que comprende una secuencia de al menos el 60 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.
10. Un procedimiento para sensibilizar una planta contra infecciones fúngicas, comprendiendo el procedimiento realizar en dicha planta un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

FIGURA 1




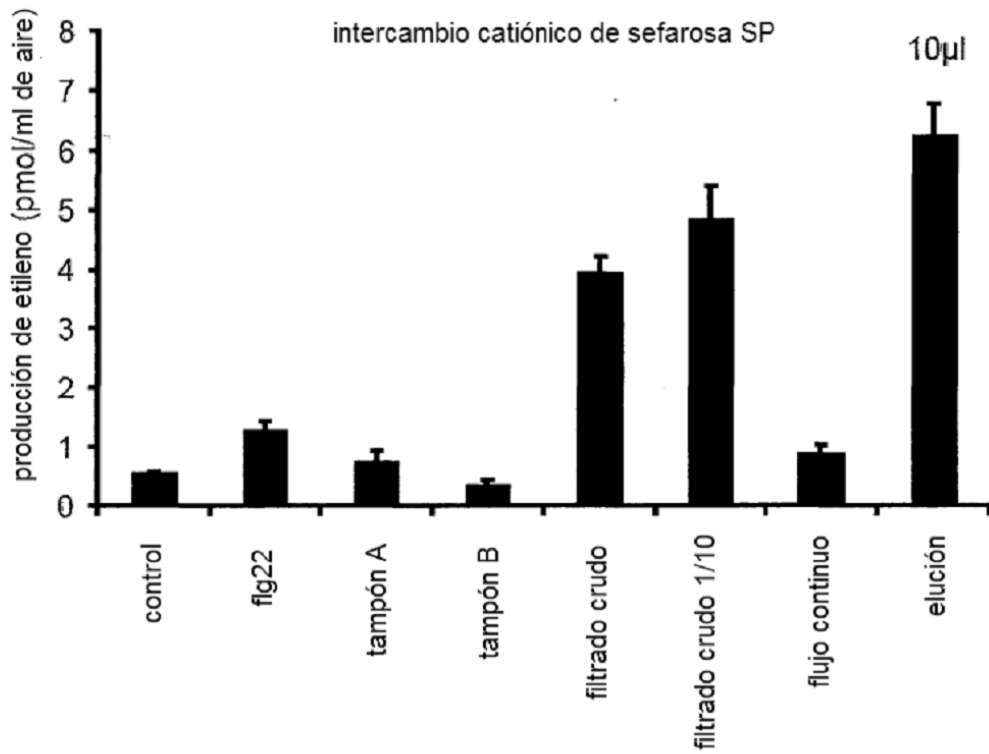
Respuesta a etileno : 

FIGURA 2



tampón A: Mes, pH 5,4, 50 o 100 mM

tampón B: Mes, pH 5,4, 50 o 100 mM, KCl 0,5 M

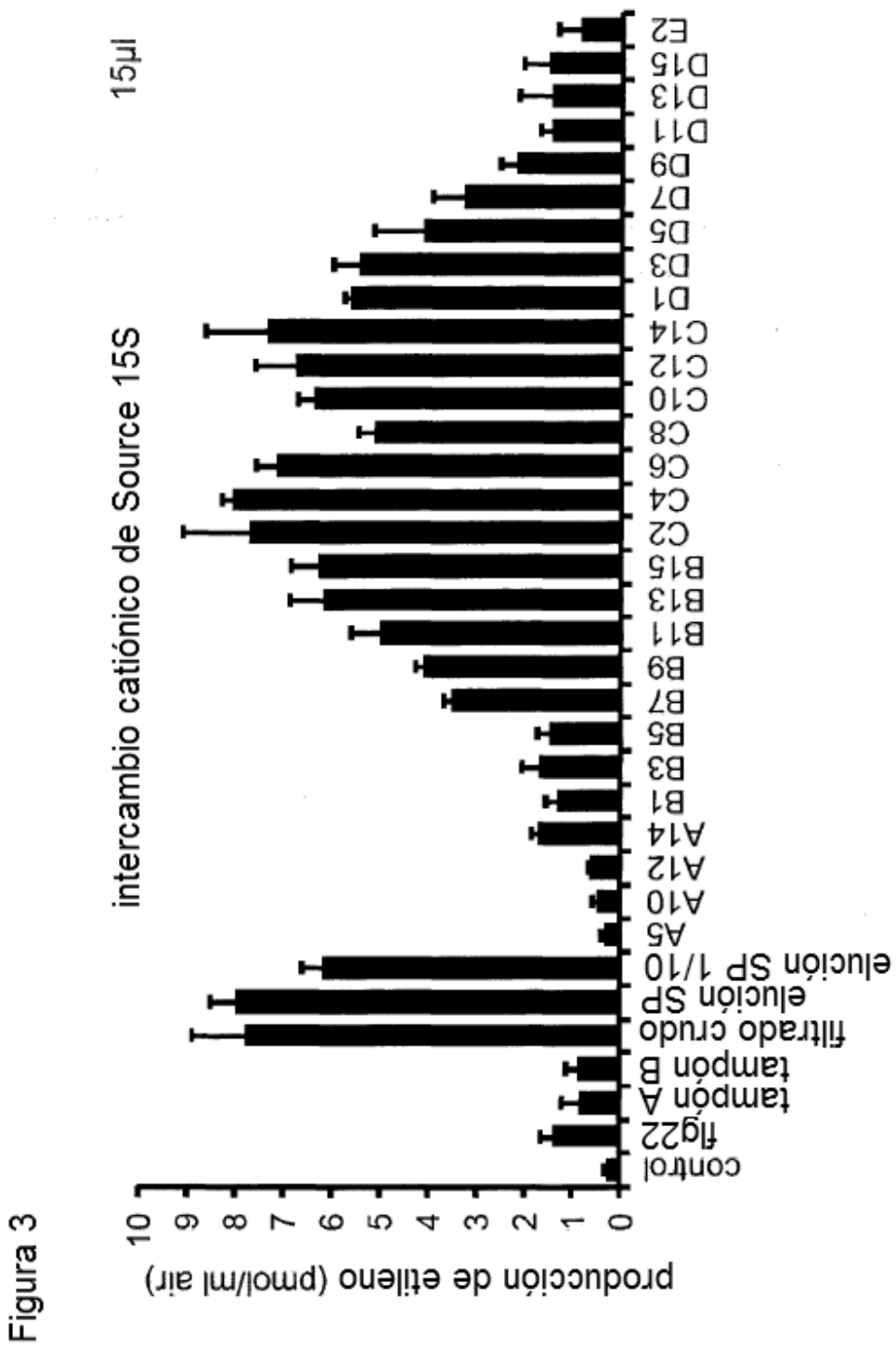


Figura 4

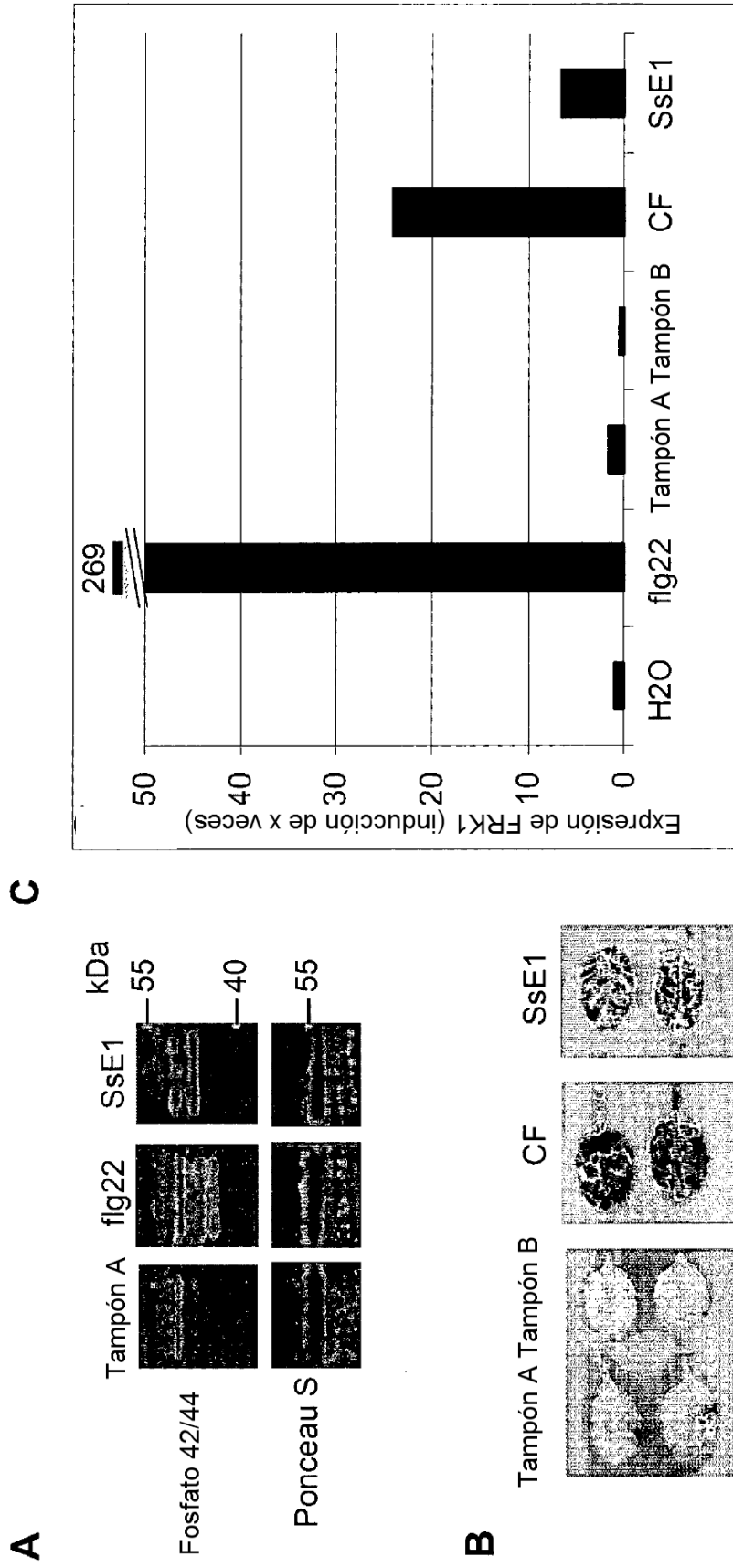


Figura 5

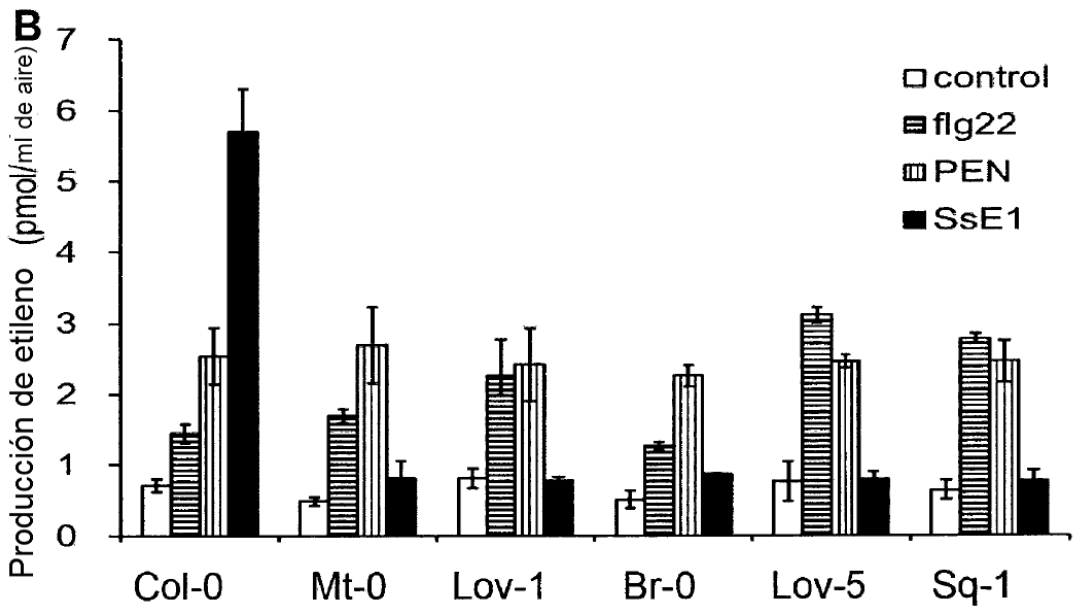
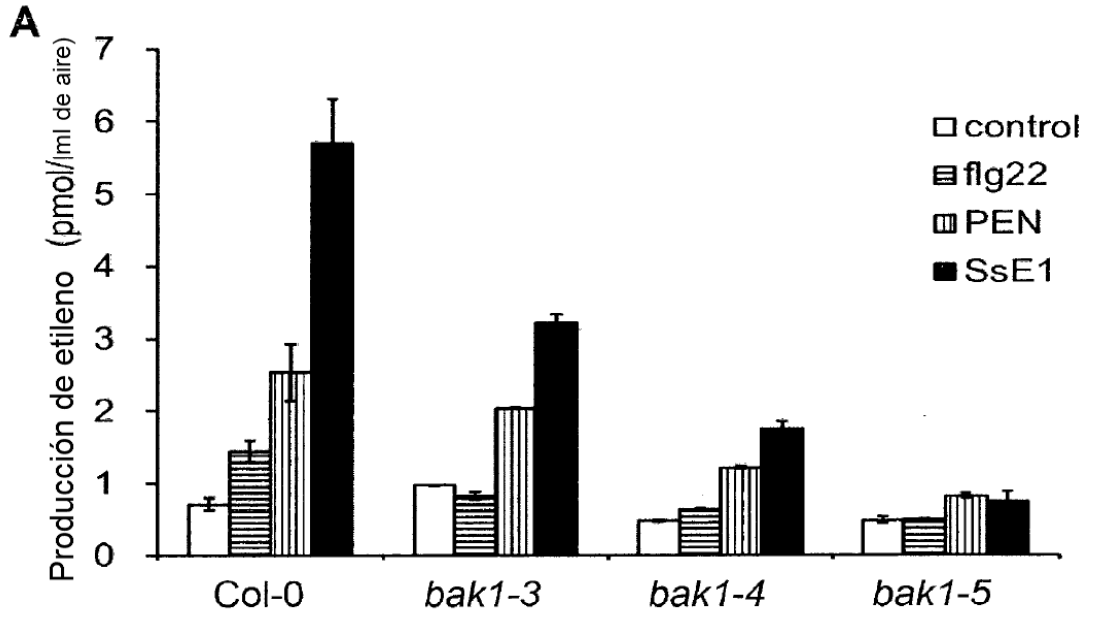


Figura 6

