

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
26 de Marzo de 2009 (26.03.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/037369 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/29 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)

(74) Mandatarios: ARIZTI ACHA, Monica etc.; C/Hermosilla, 3, E-28001 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2008/000595

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de presentación internacional:
19 de Septiembre de 2008 (19.09.2008)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200702498
21 de Septiembre de 2007 (21.09.2007) ES

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA [ES/ES]; Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): CAR-RASCO JIMÉNEZ, José Luis [ES/ES]; Jose Chabas Bordehore,, 3-Bloque 2 Puerta 19,, E-46019 Valencia (ES). CASTELLÓ LLOPIS, María José [ES/ES]; Luis Oliag, 35 puerta 21,, E-46006 Valencia (ES). VERA VERA, Pablo [ES/ES]; Sierra Calderona 36,, E-46530 Puzol, Valencia (ES).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones
- con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición

(54) Title: MANIPULATION OF THE FUNCTION OF AtDBP1 IN ORDER TO GENERATE POTYVIRUS RESISTANCE

(54) Título: MANIPULACIÓN EN LA FUNCIÓN DE ATDBP1 PARA GENERAR RESISTENCIA FRENTE A POTYVIRUS

(57) Abstract: The invention relates to the use of a mutation for the generation of virus-resistant mutant plants and, specifically, to the use of mutation 8.1 of the AtDBP1 gene of *Arabidopsis thaliana* in order to modify the phenotype of the plant as a regulator of plant potyvirus resistance, as well as to the resulting genetically modified plants having greater potyvirus infection resistance than unmodified plants.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a la utilización de una mutación para la generación de plantas mutantes resistentes a virus, concretamente la utilización de la mutación 8.1 del gen AtDBP1 de la *Arabidopsis thaliana* para modificar el fenotipo de la planta como regulador de la resistencia en plantas frente a potyvirus, así como las plantas obtenidas genéticamente modificadas cuya resistencia a la infección frente al potyvirus es mayor que en las plantas sin modificar.



WO 2009/037369 A1

MANIPULACIÓN EN LA FUNCIÓN DE AtDBP1 PARA GENERAR RESISTENCIA FRENTE A POTYVIRUS

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a la utilización de una mutación para la
generación de plantas mutantes resistentes a virus, concretamente la utilización de la
mutación 8.1 del gen AtDBP1 de *Arabidopsis thaliana* como regulador de la resistencia
en plantas frente a potyvirus para modificar el fenotipo de la planta, así como las
plantas obtenidas genéticamente modificadas cuya resistencia a la infección frente al
10 potyvirus es mayor que en las plantas sin modificar.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 En la naturaleza, todos los organismos vivos han de estar continuamente
defendiéndose de su interacción con otros seres para su supervivencia. Las plantas
15 coexisten con multitud de microorganismos patógenos como bacterias, virus, hongos,
etc., sin embargo, en el mundo vegetal, la enfermedad constituye una excepción y ello
se debe a los múltiples mecanismos de defensa que las plantas poseen frente a estos
patógenos. Algunos de estos mecanismos son constitutivos, estando establecidos en
la planta antes de la llegada del patógeno; mientras que otros se inducen tras la
20 percepción del mismo y proporcionan protección no sólo en el sitio de infección sino
sistémicamente a lo largo de toda la planta (Dempsey *et al.*, *Crit. Rev. Plan Sci. V. 18*,
pp.547-575, 1999). El conocimiento de las rutas de señalización implicadas en la
respuesta defensiva y los procesos que subyacen a la interacción entre la planta y el
patógeno, representa un indudable interés tanto básico como aplicado. Esto facilitaría
25 el diseño de estrategias encaminadas a la obtención de variedades vegetales de
mayor resistencia a patógenos, así como también el control de las enfermedades en
las especies cultivables para aumentar el rendimiento, la calidad y la seguridad de la
cosecha ya que se estima que las pérdidas de rendimiento por causas debidas a

patógenos representan alrededor del 10-20% (Kreps *et al.*, *Plant Physiol. Vol. 130, pp. 2129-2141, 2002*).

Las enfermedades que causan los virus en las plantas pueden dañar las hojas, los tallos, las raíces, los frutos, las semillas o las flores, y son responsables de un porcentaje considerable de las pérdidas económicas debidas a la reducción del rendimiento en las cosechas y en la calidad (Agrios, 1988. *Plant Pathology, 3rd Ed., San Diego, CA, Academic Press, p. 655*). Por esto, los virus de plantas se consideran la mayor amenaza para la agricultura moderna, provocando bajas en la productividad y productos imperfectos o de baja calidad en muchos cultivos y plantas ornamentales en todo el mundo. Dado el carácter generalizado y persistente de las enfermedades provocadas por estos patógenos, se hace necesario establecer métodos de control adecuados para prevenir infecciones, proteger los cultivos y minimizar así las pérdidas agrarias.

Los virus de plantas se clasifican en virus de RNA y virus de DNA según la naturaleza de su material genético, siendo los de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva los más frecuentes (Hull, 2002. *Matews' Plant Virology, Academic Press*). La infección se produce a través de heridas causadas por daños físicos debidos al medio ambiente o por la acción de vectores como insectos, ácaros, nemátodos y ciertos hongos habitantes del suelo. En el citoplasma, el virus de RNA se desensambla, se replica, traduce sus mensajeros a proteínas y se moviliza local y sistémicamente (Stange, *Cien. Inv. Agr. Vol. 33, pp. 1-18, 2006*). Para poder reproducirse, el virus utiliza energía y proteínas de la célula hospedadora. Durante cada etapa del ciclo viral se generan complejas interacciones entre la planta hospedadora y el virus, que están siendo objeto de intenso estudio en los últimos años. Por ejemplo ciertos componentes de la planta hospedadora como microtúbulos, filamentos de actina/miosina y calreticulina facilitan la infección y el movimiento del virus en la planta (Boevnik y Oparka, *Plant Physiol. Vol. 138, pp. 1815-1821, 2005*; Chen *et al.*, *Plant Physiol. Vol. 138, pp. 1866-1876, 2005*). Sin embargo, aún se desconoce la identidad de todos los factores, inherentes al hospedador, involucrados en el ciclo viral. Sin duda su conocimiento es uno de los mayores desafíos que tiene planteado el campo de la virología con las miras puestas en generar resistencias a infecciones víricas en cultivos de interés económico y medioambiental.

Frente a la lentitud y la complejidad de los programas de mejora genética clásica, se han desarrollado estrategias biotecnológicas basadas en la obtención de plantas transgénicas para generar resistencia a infecciones virales. En este sentido, el concepto de resistencia derivada del virus propuesto por Sanford y Johnston (*J. Theor. Biol. Vol 115, pp. 395-405, 1985*) es el que se ha empleado con mayor éxito y se basa en la expresión en la planta de genes virales. Ello podría interferir con el ciclo viral o activar mecanismos de silenciamiento génico. El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), también conocido como silenciamiento de RNA, es un mecanismo fundamental de defensa antiviral en plantas. Es un proceso de control de la expresión génica a nivel post-transcripcional que conduce a la supresión de elementos genéticos foráneos como virus y transposones a través de un mecanismo específico de degradación de RNA (Baulcombe, *Nature, Vol. 431, pp. 356-363, 2004*; y *Trends Biochem. Sci. Vol. 30, pp. 290-293, 2005*).

En los organismos vegetales se conocen al menos tres vías para el silenciamiento de RNA: el silenciamiento citoplasmático por RNAs pequeños interferentes (siRNA), el silenciamiento de mRNA endógenos por microRNA (miRNA) y el silenciamiento asociado a la metilación de DNA y supresión de la transcripción. Todas estas vías implican la rotura de moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) en RNAs pequeños tales como siRNA y miRNA. (Baulcombe, *Natur, Vol. 431, pp. 356-363, 2004*). Entre las limitaciones que presentan las tecnologías basadas en el silenciamiento de RNA cabe destacar el requerimiento de una alta especificidad de secuencia para la degradación de RNA (Ritzenthaler, *Curr. Opin. Biotechnol. Vol. 16, pp. 118-122, 2005*). Además, los virus han desarrollado la capacidad de codificar supresores de este mecanismo de defensa antiviral innato. De entre las proteínas supresoras, la HCPPro (helper component-protease) codificada por los potyvirus (y Vaucheret, *Science. Vol. 292, pp. 2277-2280, 2001*) ha sido una de las más estudiadas. Por todo ello, la aplicación de estas estrategias podría ser limitada y poco eficaz en generar resistencia frente un amplio rango de virus.

En otros casos, se ha recurrido a la expresión de genes de resistencia de la planta o genes *R*. Estos genes son los responsables del reconocimiento del invasor mediante la interacción directa o indirecta del producto de su expresión con factores de avirulencia (*Avr*) del patógeno. Dicho reconocimiento desencadena un programa de

muerte celular en el sitio de infección o reacción hipersensible que bloquea la dispersión del patógeno y conduce a la activación de la respuesta defensiva. Se han identificado genes de resistencia a determinados virus en diferentes especies vegetales, tal como el gen *N* de tabaco (*Nicotiana tabacum*), el cual confiere resistencia frente al virus del mosaico del tabaco (TMV), siendo un modelo clásico en el estudio de las interacciones planta-virus (Whitham *et al.*, *Cell*, Vol. 78, pp. 1101-1115, 1994; y *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, pp. 8776-8781, 1996; Dineshkumar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol 92, pp. 4175-4180, 1995.). También se han identificado genes con similitud estructural en especies de interés agronómico denominados análogos a genes de resistencia (RGA) (Shen *et al.* *Mol. Plant Microbe Interact.* Vol. 11, pp. 815-823, 1998; Deng *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* Vol. 101, pp. 814-822, 2000; Di Gaspero and Cipriani, *Theor. Appl. Genet.* Vol. 106, pp. 163-172, 2002; Baldi *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* Vol. 109, pp. 231-239, 2004; Dondini *et al.*, *J. Horticul. Science and Biotech.* Vol. 79, pp. 729-734, 2004; Soriano *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* Vol. 110, pp. 980-989, 2005). Sin embargo, dado que los genes de resistencia normalmente reconocen específicamente determinadas estirpes del patógeno, su aplicabilidad general es muy limitada. Por otra parte, la rápida evolución de cepas virales capaces de eludir los mecanismos de resistencia de la planta demanda nuevos conceptos en el desarrollo de variedades vegetales resistentes a patógenos.

En contraste con la resistencia de carácter dominante mediada por genes R y el silenciamiento de RNA, existen mecanismos alternativos de resistencia que por sus especiales características son denominados como de naturaleza recesiva. La resistencia recesiva sería el resultado de un mecanismo pasivo que hace a una planta resistente debido a la falta de un factor del hospedador específico requerido por el virus para completar su ciclo, o debido a la presencia de una versión mutada de este factor (Fraser, *Annu. Rev. Phytopathol.* Vol. 28, pp. 179-20, 1990; y *Academic Press*, pp. 1300-1307. San Diego, CA, 1999). Los Potyvirus son aproximadamente un 30% de todos los virus de plantas conocidos y como grupo son muy destructivos en la agricultura (Ward *et al.*, 1991).

La información disponible sobre interacciones incompatibles entre virus y plantas controlada en el hospedador por genes de resistencia recesivos es menor y más dispersa (Díaz- Pendón *et al.*, 2004. *Mol. Plant Pathol.* Vol. 5, pp. 223-233, 2004).

Los virus dependen de la maquinaria bioquímica del hospedador para completar su ciclo biológico. Así, la infección con éxito de una planta requiere una serie de interacciones compatibles entre factores del hospedador y factores virales a lo largo de un proceso complejo que incluye la expresión y replicación del genoma viral, el movimiento célula a célula y la translocación a larga distancia a través del sistema vascular de la planta (Carrington *et al.*, *Plant Cell Vol. 8*, pp. 1669-1681, 1996; Maule *et al.*, *Curr. Opin. Plant Biol. Vol. 5*, pp. 279-284, 2002).

Algunos de estos factores del hospedador requeridos para la expresión génica del virus o replicación, se han identificado mediante el análisis de poblaciones mutagenizadas. Así, en *Arabidopsis thaliana* se ha demostrado que TOM1 y TOM2A se requieren para una eficiente multiplicación del virus del mosaico del tabaco en protoplastos de *Arabidopsis*. Se trata de proteínas transmembrana del hospedador que interaccionan entre ellas y con proteínas de la replicación viral codificadas por el virus siendo esenciales para formar el complejo de replicación tobamoviral (Hagiwara *et al.*, *EMBO J. Vol 22*, pp.344-353,2003; Ishikawa *et al. J. Virol. Vol. 67*, pp. 5328-5338, 1991; *Mol. Gen. Genet. Vol. 230*, pp. 33-38, 1993; Ohshima *et al., Virology Vol. 243*, pp. 472-481, 1998; Tsujimoto *et al. EMBO J., Vol. 22*, ppl 335-343, 2003; Yamanaka *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 97*, pp. 10107-10112, 2000; y *J. Virol. Vol. 76*, pp. 2491-2497, 2002). Con una aproximación similar, también se demostró que una de las isoformas del factor de inicio de la traducción eucariótico eIF(iso)4E era necesaria para la multiplicación del potyvirus *Turnip mosaic virus* (TuMV) y del *Tobacco etch virus* (TEV) (Duprat *et al., Plant J. Vol. 32*, pp. 927-934, 2002; Lellis *et al. Curr. Biol. Vol. 12*, pp. 1046-1051, 2002; Whitham *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96*, pp. 772-777,1999). Además, se han identificado varios mutantes de *Arabidopsis* en los cuales está restringido el movimiento viral, tales como *cum1-1* y *cum2-1*, donde está afectada la propagación del virus *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Yoshii *et al., Plant J. Vo. 13*, pp. 211-219, 1998^a) y la del CMV y *Turnip crinkle virus* (TCV) (Yoshii *et al., J. Virol. Vol. 72*, pp. 8731-8737, 1998b), respectivamente; y *vsm1* en el cual el movimiento sistémico de un tobamovirus está específicamente afectado (Larley *et al., Mol. Plant-Microbe Interact. Vol. 11*, ppl 706-709, 1998). Los mutantes *cum1-1* y *cum2-1* tienen alterados los genes eIF4E y eIF4G respectivamente (Yoshii *et al., J. Virol. Vol. 78*, pp. 6102, 2004). La mayoría de los casos de resistencia recesiva se han descrito en

especies cultivadas, pero sólo se han identificado genes implicados en pimiento y lechuga, tratándose en ambos casos del factor de inicio de la traducción eIF4E, y frente a potyvirus (Nicaise *et al. Plant Physiol. Vol. 132, pp. 1272-1282, 2003*; Ruffel *et al. Plant J. Vol. 32, pp. 1067-1075, 2002*). Por tanto, aunque la información disponible
5 sobre los mecanismos responsables es muy escasa, parece existir un estrecho vínculo entre factores de inicio de la traducción y la resistencia a virus (Robaglia y Caranta, *Trends Plant Sci. Vol. 11, pp. 40-45, 2006*).

La solicitud de patente WO 01/34823 A2, con título: "Method for enhancing resistance in plants" se refiere a la inducción de resistencia en plantas contra un
10 amplio espectro de patógenos, específicamente, virus, bacterias y hongos por medio de la expresión viral de una poliproteína codificada por miembros del grupo de los potyvirus. Dicho método para la protección de las plantas contra patógenos comprende: a) transformar una célula de la planta con un gen funcional u otros supresores de silenciadores de genes, b) identificar las células transformadas de la
15 planta, y c) regenerar una planta transformada a partir de la célula transformada.

El documento US 5,986,175, cuyo título es "Virus resistant plants" describe y reivindica como conferir resistencia a plantas por medio de la expresión en la planta de una secuencia aislada de DNA que comprende nucleótidos que codifican una replicasa de potyvirus, y citan un gran número de potyvirus. Los mismos autores, en el
20 documento de patente US 5,589,612 confieren resistencia a plantas frente a potyvirus utilizando una proteasa de potyvirus para el procedimiento.

En el documento WO 95/04825 A1 con título "Improvements in or relating to disease resistance of plants" también se describe el aumento de resistencia conferido a las plantas por medio de una proteasa de potyvirus. Concretamente, describe una
25 molécula de DNA que codifica una porción de la replicasa de potyvirus que, una vez introducida en la planta apropiada, es capaz de aumentar la resistencia de dicha planta a las enfermedades virales. También describe las plantas transgénicas que poseen una resistencia aumentada contra las enfermedades de los virus.

En la solicitud de patente WO 94/16097 A1, cuyo título es "Plantes transgeniques résistantes aux virus vegetaux et procédé d'obtention" se describe y
30

reivindica una planta resistente a potyvirus que contiene en su genoma uno o más fragmentos de ADN que expresa los transcritos correspondientes a una proteína o parte de una proteína de un virus donante, excepto una proteína de la capsida y de la proteasa NIa del TMV (Tobacco Mosaic Virus) entera, obteniéndose dicha planta mediante la introducción de vectores obtenidos del virus donante.

El documento de patente concedida ES 2 166 361 T3, cuyo título es "Producción de plantas resistentes a los virus a través de la introducción de RNA viral intraducible de sentido positivo" se describe y reivindica un método para producir una planta con una susceptibilidad reducida a la infección viral, que comprende: a) transformar células de planta con una molécula de DNA que codifica moléculas de RNA viral intraducible de sentido positivo, en donde dicha molécula de RNA se deriva de la secuencia nucleotídica de un gen de virus de planta, y b) regenerar una planta que comprende la célula de planta transformada. La molécula de RNA viral intraducible de sentido positivo puede derivarse de un potyvirus; y también puede contener al menos una mutación que hace intraducible a la molécula de RNA, y la expresión de dicha molécula de RNA dentro de la planta reduce la susceptibilidad de la planta a la infección por virus.

La solicitud de patente WO 2004/057941 A2, con título: "Recessive plant viral resistance results from mutations in translation initiation factor eIF4E" se refiere a un método para conferir a las plantas resistencia a virus, principalmente resistencia frente a potyvirus. El método implica el silenciamiento del gen que codifica el factor eIF4E de iniciación de transcripción en la planta, en condiciones efectivas para conferir a la planta resistencia frente al virus.

Este silenciamiento comprende: proporcionar una planta transgénica o semilla de planta transformada con moléculas heterólogas de ácido nucleico que silencian el gen que codifica para el eIF4E en la planta, y después crecer la planta transgénica o la planta transgénica crecida a partir de la semilla transformada en condiciones efectivas para conferir a dicha planta transgénica resistencia al virus. Dichas moléculas heterólogas pueden ser oligonucleótidos antisentido o sentido complementarios (admitiéndose distintos grados de complementariedad en la secuencia) al mRNA que codifica para el factor eIF4E. Dicho ácido nucleico, puede ser también iRNA (RNA

interferente). Tanto la planta transgénica como la semilla de planta transformada con las moléculas heterólogas pueden ser seleccionadas de un amplio grupo que incluye *Arabidopsis thaliana*.

5 En otro aspecto, este método comprende la sobreexpresión de una molécula de ácido nucleico que codifique un factor heterólogo de iniciación de la transcripción, el eIF4E, así como un sistema de expresión que contenga la construcción génica y la célula huésped transformada con la construcción génica.

10 El documento describe y reivindica las construcciones génicas, el sistema de expresión que comprende las construcciones génicas, la célula huésped transformada, las plantas transformadas, etc., que intervienen en el logro de la resistencia frente a potyvirus.

En resumen, el documento describe y reivindica la obtención de resistencia recesiva a potyvirus en plantas gracias a mutaciones en el factor de inicio de traducción eIF4E.

15 El documento WO 03/000898 A1, con título: "Plant genes involved in defense against pathogens" presenta el uso de diferentes genes vía su represión (entre otras posibilidades), para conferir resistencia frente a ciertos tipos de potyvirus (entre otros patógenos).

20 La invención describe 228 genes identificados como útiles para conferir resistencia frente a más de un patógeno (bacterias, oomycetes y virus). Así mismo, identifica genes que se sobreexpresan o cuya expresión se ve disminuida en respuesta a infecciones virales.

25 Por lo tanto, la invención proporciona tanto plantas transgénicas cuyo genoma es aumentado por una molécula de ácido nucleico de la invención como plantas transgénicas, en cuyo genoma el gen correspondiente es interrumpido, dando lugar a pérdida, disminución o alteración en la función del producto codificado por dicho gen (con respecto a la planta salvaje), adquiriendo estas plantas la capacidad de resistencia o tolerancia frente a determinados virus u otros patógenos.

Los patógenos pueden ser bacterias, hongos o virus. Dentro de los posibles virus se citan distintos tipos de potyvirus.

El documento presenta la posibilidad de represión de genes de *Arabidopsis* así como de genes que codifican para proteínas de unión a DNA y fosfatasa. Sin embargo, ninguno de los genes presentados se corresponde con AtDBP1.

En el artículo "A novel transcription factor involved in plant defense endowed with protein phosphatase activity", (Carrasco *et al.*, *The EMBO Journal*, Vol. 22 No. 13 pp. 3376-3384, 2003), los mismos autores de la presente solicitud describen por primera vez la proteína DBP1 de plantas de tabaco.

Este artículo se centra en el efecto represor del factor de la transcripción DBP1 sobre la transcripción del gen CEV11 (que codifica para una proteína que se expresa en la respuesta frente a interacciones compatibles planta-virus). En dicho documento, mediante estudios *in vitro*, han demostrado que DBP1 se une de forma específica a secuencias del promotor del gen CEV11.

Además, para demostrar la relación entre DBP1 y la regulación transcripcional de CEV11, se construyen plantas transgénicas de tabaco que presentan una construcción DBP1 antisentido en las que el nivel de expresión del gen DBP1 se ve severamente reducida. En estas plantas se demuestra que, en ausencia de DBP1, se produce la acumulación de CEV11 (sugiriendo el papel represivo de este nuevo regulador en el control transcripcional de genes diana).

En el trabajo desarrollado, hacen referencia a las PP2C como moduladores negativos de las rutas de señalización por estrés en plantas (entre otros). Así mismo, muestran a CEV11 como gen relacionado con la defensa, inducible como consecuencia de infección viral y cuya transcripción es regulable por DBP1.

Se muestra especial atención a CEV11 y a su papel en el control de la susceptibilidad a enfermedades en plantas, no haciendo ninguna alusión a la posibilidad de utilizar la represión de la expresión DBP1 como mecanismo para conferir resistencia a plantas frente a potyvirus, ni tampoco de una posible relación entre DBP1 y eIF(iso)4E.

En este artículo no se hace ninguna referencia a AtDBP1 (es decir, a DBP1 de *Arabidopsis thaliana*) ni a posibles isoformas de DBP1.

En el artículo "A novel DNA-Binding Motif, Hallmark of a New Family of Plant Transcription Factors", (Carrasco *et al.*, Plant Physiology. Vol. 137, pp. 602-606, 2005) los autores de la presente solicitud describen una nueva familia de factores de transcripción específicos de plantas, la familia de factores de transcripción DBP, entre los que se encuentra AtDBP1. Así, indica la conservación del dominio de unión a DNA de estos factores de la transcripción, como base para futuros estudios de las funciones reguladoras de dichos factores. Durante el estudio, crean dos versiones mutadas de DBP1 de tabaco: mut1 y mut2 en las que sustituyen ciertos aminoácidos de la región conservada en N-terminal por alanina, dando lugar a proteínas que pierden su habilidad de unión a DNA.

El artículo muestra que en *Arabidopsis* se han identificado 5 genes que codifican para proteínas relacionadas con DBP1. De todas ellas, la que mayor similitud a DBP1 presenta es AtDBP1 (At2g25620; GenBak, accession number: NM_128120[GenBank]).

Por último, los autores de la presente solicitud de patente, en el artículo "14-3-3 Mediates Transcriptional Regulation by Modulating Nucleocytoplasmic Shuttling of Tobacco DNA-binding Protein Phosphatase-1" (Carrasco *et al.*, J. Biol. Chem. Vol. 281, Issue 32, 22875-22881, 2006) identifican la isoforma G de la proteína de tabaco 14-3-3 como la primera proteína que interactúa con el factor DBP. Se sirven de dicha proteína para comprender el mecanismo que subyace bajo esta familia de reguladores transcripcionales.

Este artículo presenta la interacción tanto de DBP1 como de AtDBP1 con sus isoformas correspondientes de 14-3-3, interacción que regula positivamente la inducción del gen CEV11. Para localizar la zona de unión entre DBP1 y 14-3-3, construyen mutantes delecionados en DBP1: del 1 (que mantiene N-terminal y por tanto interacciona con 14-3-3) y del 2 (delecionado en N-terminal y que no se une a 14-3-3). Para determinar la posición exacta, hacen varias deleciones.

Así, realizan pruebas con 14-3-3 λ de *Arabidopsis* (ortólogo funcional de 14-3-3 G de tabaco). Comparan la interacción de AtDBP1 con 14-3-3 λ y comprueban que ambas proteínas interaccionan a través de la región N-terminal. Estos resultados refuerzan el significado biológico de la interacción DBP1 14-3-3G.

- 5 Resumiendo, concluyen que la isoforma 14-3-3G regula positivamente la inducción del gen CEV11 de tabaco por interacción directa con DBP1.

OBJETO DE LA INVENCION

10 El objeto de la presente invención se refiere a la utilización de la mutación 8.1 del gen AtDBP1 de *Arabidopsis thaliana* (Gen At2g25620; Gen Bank, accesión number NM_128120) para modificar el fenotipo de la planta de forma que la planta resultante presente un aumento de resistencia a la infección por potyvirus comparada con la planta de tipo salvaje.

15 Otro objeto de la presente invención se refiere al uso del gen AtDBP1 en especies de interés agronómico e industrial como regulador de la respuesta frente a potyvirus en plantas. Ese uso conlleva la pérdida de función del gen AtDBP1 conduciendo a una menor acumulación de eIF(iso)4E, que daría lugar a resistencia o menos susceptibilidad a potyvirus.

20 Como regulador se entiende el gen, y por tanto la proteína por él codificada, que regula el mecanismo o parte del mecanismo que subyace y que es utilizado por los virus en cuestión en el presente estudio para penetrar, multiplicarse e infectar la planta.

25 En la descripción de la invención, se realizan estudios sobre la implicación del gen *AtDBP1* en la resistencia o disminución de susceptibilidad frente a potyvirus. Los experimentos se realizan con la línea mutante 8.1 de *Arabidopsis thaliana*, en la que el gen *AtDBP1* está interrumpido por inserción de T-DNA en el segundo exón de su secuencia codificante, interrumpiendo la región N-terminal de la proteína por el motivo DNC, de manera que la acumulación de su mRNA está inhibida. Es decir, una pérdida de función caracterizada por no expresión de m-RNA. Las plantas mutantes son

expuestas a dos tipos diferentes de potyvirus, comprobándose que efectivamente su resistencia o falta de susceptibilidad a dichos potyvirus, se ve incrementada.

Otro objeto de la invención es la utilización de la mutación 8.1 del gen *AtDBP1* de *Arabidopsis thaliana* para generar plantas caracterizadas por presentar una resistencia al potyvirus Plum Pox Virus (PPV) mayor que la de la planta de tipo salvaje. Dicha resistencia se detecta mediante análisis por RT-PCR.

Y finalmente otro objeto de la invención es la utilización de la mutación 8.1 del gen *AtDBP1* de *Arabidopsis thaliana* para generar plantas caracterizadas por presentar síntomas atenuados tras la infección por el potyvirus Turnip Mosaic Virus (TuMV), lo cual no ocurre con la planta de tipo salvaje.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Caracterización del mutante de inserción 8.1, portador de una inserción de T-DNA en el gen *AtDBP1*. **A**, Estructura del gen *AtDBP1*. El gen *AtDBP1* consta de 4 exones (que aparecen indicados con rectángulos negros) separados por 3 intrones. La línea 8.1 (SALK_005240) posee una inserción de T-DNA que interrumpe la secuencia codificante del gen *AtDBP1* en el segundo exón. **B**, Análisis de la expresión del gen *AtDBP1* en la línea de inserción 8.1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR usando cebadores específicos para el gen *AtDBP1* en comparación con plantas silvestres Col-0.

Figura 2. Análisis de la expresión de *AteIF(iso)4E* en la línea de inserción de *AtDBP1* 8.1. **A**, Western-blot de extractos proteicos obtenidos a partir de hojas de plantas silvestres Col-0 y dos lotes diferentes de plantas de la línea mutante 8.1, 8.1(1) y 8.1(2). A la izquierda se indica la migración de las proteínas marcadoras empleadas en función de su tamaño molecular. Como control de carga se muestra un detalle de la tinción de la membrana de nitrocelulosa con Ponceau-S después de la transferencia. **B**, Análisis de la acumulación del RNA mensajero de *AteIF(iso)4E* en plantas silvestres Col-0 y en la línea de inserción 8.1 mediante RT-PCR. Electroforesis en gel de

agarosa de los productos de amplificación obtenidos usando cebadores específicos para el gen *AtelF(iso)4E* (arriba) y para el gen *AteEF1a*, que se incluye como control (abajo), en comparación con plantas silvestres Col-0. Bajo el detalle del gel se muestra la cuantificación relativa de cada producto de amplificación respecto al obtenido a partir de plantas Col-0.

Figura 3. Análisis de la interacción entre AtDBP1 y AtelF(iso)4E. **A**, Sistema de doble híbrido en levadura: crecimiento en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de histidina de cepas de levadura que expresan diferentes regiones de la proteína AtDBP1 fusionadas al dominio de unión a DNA de GAL4 y una fusión de AtelF(iso)4E al dominio de activación transcripcional del mismo factor. La capacidad de las células de levadura para crecer en medio sin histidina depende de la interacción entre las 2 proteínas de fusión y la activación subsiguiente de la transcripción del gen marcador *HIS3*. El medio sin histidina se suplementó con 3-amino-triazol, un inhibidor del enzima *HIS3*, con objeto de aumentar la presión selectiva. **B**, Coimmunoprecipitación de AtDBP1 y AtelF(iso)4E: Western-blot de las fracciones inmunoprecipitadas con anticuerpos frente el epítipo de hemaglutinina (HA) a partir de extractos proteicos de hoja obtenidos de plantas Col-0 (1) y plantas transgénicas que expresan AtDBP1 fusionada a dicho epítipo (2). El Western-blot se reveló con anticuerpos anti-AtelF(iso)4E.

Figura 4. Análisis de la acumulación y distribución viral en plantas de la línea mutante 8.1 y plantas silvestres Col-0 tras la inoculación con el virus de la sharka (Plum Pox Virus o PPV) fusionado al reportador GFP. **A**, Acumulación del RNA viral: amplificación mediante PCR cuantitativa de cDNA obtenido de hojas no inoculadas de plantas control Col-0 y plantas de la línea de inserción 8.1 infectadas con una versión del virus que incluye la secuencia codificante de la proteína fluorescente verde GFP (PPV-GFP), 20 días después de la inoculación. Las barras blancas representan la amplificación del RNA viral usando cebadores específicos para GFP. Como control se incluye el gen *ACTINA8* (barras negras). Los números que figuran sobre las barras indican la cuantificación de la diferencia observada entre Col-0 y 8.1 después de normalizar los resultados obtenidos con los del control respectivo. **B**, Acumulación de proteína viral: Western-blot de extractos proteicos de hoja obtenidos antes de inocular plantas Col-0 y 8.1 con PPV-GFP (t_0) y 20 días después de la inoculación (t_{20}),

inmunodecorado con un anticuerpo policlonal anti-GFP. A la derecha se indica la migración del marcador de peso molecular empleado. C, Análisis de la distribución del virus en hojas inoculadas (paneles superiores) y no inoculadas o sistémicas (paneles inferiores) de plantas Col-0 (izquierda) y 8.1 (derecha), mediante microscopía de fluorescencia para la detección de GFP.

Figura 5. Infección con el virus del mosaico del nabo (Turnip Mosaic Virus o TuMV). Sintomatología observada en plantas Col-0 (parte superior) y 8.1 (parte inferior) tras la infección con TMV.

Figura 6. Secuencia nucleotídica del gen AtDBP1 (At2g25620). En negrita y mayúsculas se indican los exones, y en minúscula los intrones y regiones 5' y 3' no traducidas.

Figuras 7. Secuencia nucleotídica del gen AtDBP1 (At2g25620) en el mutante 8.1 (SALK_005240). En negrita y mayúsculas se indican los exones, en minúsculas los intrones y regiones 5' y 3' no traducidas, y subrayada la secuencia que correspondería al T-DNA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La familia de los potyvirus representa un gran número de patógenos virales de plantas que colectivamente pueden infectar la mayoría de las especies de cultivo. La infección por potyvirus puede inducir una variedad de síntomas incluyendo el moteado foliar, la distorsión de semillas y los frutos, así puede comprometer gravemente el rendimiento y/o la calidad del cultivo. La familia de los potyvirus o *Potyviridae* incluye las especies definitivas: *Alstroemeria mosaic potyvirus*, *Amaranthus leaf mottle potyvirus*, *Araujia mosaic potyvirus*, *Arracacha Y potyvirus*, *Artichoke latent potyvirus*, *Asparagus 1 potyvirus*, *Banana bract mosaic potyvirus*, *Bean common mosaic necrosis potyvirus*, *Bean common mosaic potyvirus*, *Bean yellow mosaic potyvirus*, *Beet mosaic potyvirus*, *Bidens mosaic potyvirus*, *Bidens mottle potyvirus*, *Cardamom mosaic potyvirus*, *Carnation vein mottle potyvirus*, *Carrot thin leaf potyvirus*, *Cassava brown streak potyvirus*, *Cassia yellow spot potyvirus*, *Celery mosaic potyvirus*, *Chickpea bushy*

dwarf potyvirus, Chickpea distortion mosaic potyvirus, Clover yellow vein potyvirus, Commelina diffusa potyvirus, Commelina mosaic potyvirus, Cowpea green vein-banding potyvirus, Cowpea Moroccan aphid-borne mosaic potyvirus, Cowpea rugose mosaic potyvirus, Crinum mosaic potyvirus, Daphne Y potyvirus, Dasheen mosaic potyvirus, Datura Colombian potyvirus, Datura distortion mosaic potyvirus, Datura necrosis potyvirus, Datura shoestring potyvirus, Dendrobium mosaic potyvirus, Desmodium mosaic potyvirus, Dioscorea alata potyvirus, Dioscorea green banding mosaic potyvirus, Eggplant green mosaic potyvirus, Euphorbia ringspot potyvirus, Freesia mosaic potyvirus, Groundnut eyespot potyvirus, Guar symptomless potyvirus, Guinea grass mosaic potyvirus, Helenium Y potyvirus, Henbane mosaic potyvirus, Hippeastrum mosaic potyvirus, Hyacinth mosaic potyvirus, Iris fulva mosaic potyvirus, Iris mild mosaic potyvirus, Iris severe mosaic potyvirus, Johnsongrass mosaic potyvirus, Kennedyya Y potyvirus, Leek yellow stripe potyvirus, Lettuce mosaic potyvirus, Lily mottle potyvirus, Maize dwarf mosaic potyvirus, Malva vein clearing potyvirus, Marigold mottle potyvirus, Narcissus yellow stripe potyvirus, Nerine potyvirus, Onion yellow dwarf potyvirus, Ornithogalum mosaic potyvirus, Papaya ringspot potyvirus, Parsnip mosaic potyvirus, Passiflora ringspot potyvirus, Passiflora South African potyvirus, Passionfruit woodiness potyvirus, Patchouli mosaic potyvirus, Pea mosaic potyvirus, Pea seed-borne mosaic potyvirus, Peanut green mosaic potyvirus, Peanut mottle potyvirus, Pepper Indian mottle potyvirus, Pepper mottle potyvirus, Pepper severe mosaic potyvirus, Pepper veinal mottle potyvirus, Plum pox potyvirus, Pokeweed mosaic potyvirus, Potato A potyvirus, Potato V potyvirus, Potato Y potyvirus, Primula mosaic potyvirus, Ranunculus mottle potyvirus, Sorghum mosaic potyvirus, Soybean mosaic potyvirus, Statice Y potyvirus, Sugarcane mosaic potyvirus, Sweet potato feathery mottle potyvirus, Sweet potato G potyvirus, Swordbean distortion mosaic potyvirus, Tamarillo mosaic potyvirus, Telfairia mosaic potyvirus, Tobacco etch potyvirus, Tobacco vein-banding mosaic potyvirus, Tobacco vein mottling potyvirus, Tobacco wilt potyvirus, Tomato Peru potyvirus, Tradescantia-Zebrina potyvirus, Tropaeolum 1 potyvirus, Tropaeolum 2 potyvirus, Tuberose potyvirus, Tulip band-breaking potyvirus, Tulip breaking potyvirus, Tulip chlorotic blotch potyvirus, Turnip mosaic potyvirus, Ullucus mosaic potyvirus, Vallota mosaic potyvirus, Vanilla mosaic potyvirus, Vanilla necrosis potyvirus, Voandzeia distortion mosaic potyvirus, Watermelon mosaic 1 potyvirus, Watermelon mosaic 2 potyvirus, Wild

potato mosaic potyvirus, Wisteria vein mosaic potyvirus, Yam mosaic potyvirus, Zucchini yellow fleck potyvirus, Zucchini yellow mosaic potyvirus, y las especies provisionales: Asystasia gangetica mottle (?) potyvirus, Celery latent (?) potyvirus, Datura mosaic (?) potyvirus, Endive necrotic mosaic (?) potyvirus, Kalanchoe mosaic
5 *(?) potyvirus, Konjak mosaic (?) potyvirus, Nasturtium mosaic (?) potyvirus, Patchouli mottle (?) potyvirus, Shallot yellow stripe (?) potyvirus, Sweet potato vein mosaic (?) potyvirus, Welsh onion yellow stripe (?) potyvirus).*

El genoma viral de los potyvirus está constituido por una molécula simple de RNA de polaridad positiva que codifica una gran poliproteína, la cual es procesada
10 postraduccionalmente en al menos 10 proteínas maduras por tres proteasas virales. Este RNA viral está poliadenilado en su extremo 3'; y en su extremo 5', a diferencia de los mRNAs, no presenta una estructura CAP sino que es sustituida por una proteína codificada por el virus denominada VPg ("virus protein linked to the genome") la cual se une covalentemente al extremo 5' (Murphy *et al.*, *Virology*, Vol 178, pp. 285-288,
15 1990).

El hecho de que la falta de AtDBP1 se traduzca en una disminución de la acumulación de dicho factor a nivel postranscripcional, parece indicar que AtDBP1 podría estar ejerciendo un control sobre el factor de inicio de la traducción. Para ello se quiso comprobar si ambas proteínas eran capaces de interactuar físicamente. En
20 esta invención se demuestra dicha interacción, por lo que muy probablemente este factor se presente como un posible candidato para la desfosforilación mediada por AtDBP1, merced a su actividad proteín fosfatasa del tipo "C que lleva asociada.

En mamíferos, se conocen tres mecanismos para la regulación de la actividad de eIF4E. Entre estos cabe destacar una regulación del nivel de transcripción de este
25 gen; en este caso el proto-oncogen MYC se une al promotor de este factor induciendo sus niveles de expresión. También existe una modificación post-traduccional vía fosforilación a través de dos quinasas (Mnk1 y 2). Esta fosforilación de eIF4E parece aumentar la traducción, pero la forma fosforilada tiene menos afinidad por la estructura CAP; por ello se propone que la fosforilación podría darse después de la formación del
30 complejo de preiniciación 43S promoviendo así la liberación de eIF4E y el posterior "scanning" del ribosoma. Por último, el principal mecanismo para la regulación de la

actividad de eIF4E es a través de su interacción con una familia de proteínas represoras llamadas 4E-BPs (proteínas de unión a 4E). La unión de estas proteínas a eIF4E no altera la unión a la estructura CAP pero previene la interacción de eIF4E con eIF4G, suprimiendo así la formación del complejo eIF4F. La interacción de 4E-BPs con eIF4E está controlada por la fosforilación específica de residuos de serina y treonina en 4E-BP. El efecto neto de esta fosforilación de 4E-BP es la liberación de eIF4E, permitiendo que eIF4E se una activamente a eIF4G para formar el complejo eIF4F y curse de manera normal la traducción.

La presente invención establece la implicación funcional de AtDBP1, regulador transcripcional con actividad protein-fosfatasa de la familia DBP, en interacciones planta-potyvirus como un factor requerido por el virus para su replicación y/o propagación eficiente en la planta, y su uso como modulador de la respuesta defensiva. En base a ello, se demuestra que la inhibición o ausencia de la expresión del gen *AtDBP1* (Seq. Id. No. 9) y por tanto la ausencia del factor o proteína AtDBP1 permite obtener plantas con una mayor resistencia a infecciones por potyvirus.

Con el propósito de averiguar la función de AtDBP1, se generaron plantas con pérdida de función del gen *AtDBP1* (Seq. Id. No. 9). Para ello se seleccionaron plantas homocigotas a partir de una línea de inserción de T-DNA en el gen estructural *AtDBP1* (SALK_005240; Seq. Id. No. 10) la cual es portadora de una inserción en el gen *AtDBP1* que interrumpe su secuencia codificante y por tanto debe eliminar su expresión. A esta línea homocigota se la denominó línea 8.1. La inserción de T-DNA se encuentra ubicada en el segundo exón de la secuencia codificante de *AtDBP1* (Fig. 1A), interrumpiendo la región N-terminal de la proteína por el motivo DNC, el cual está implicado en la unión específica a DNA. Por tanto, en el caso de que hubiera expresión del gen *AtDBP1* en las plantas 8.1, la proteína resultante no sería funcional pues carecería de su dominio fosfatasa y de su capacidad de unión a DNA. Para comprobar el grado en que la inserción de T-DNA afectaba a la expresión del gen *AtDBP1*, se analizó por RT-PCR la acumulación del mRNA correspondiente tanto en plantas control Col-0 como plantas de la línea 8.1. El resultado de dichos análisis revela la ausencia de mRNA correspondiente al gen *AtDBP1* en la línea 8.1 (Fig. 1B). Estos resultados confirman por tanto que la expresión de AtDBP1 en las plantas 8.1

está inhibida en comparación con los niveles de expresión observados para el gen *AtDBP1* en las plantas silvestres Col-0.

La inhibición de la expresión de *AtDBP1* desencadena en la planta una menor acumulación de la proteína eIF(iso)4E.

5 Como parte de la caracterización funcional, molecular y genética del homólogo funcional de DBP1 en *Arabidopsis thaliana*, y con objeto de identificar los genes diana de *AtDBP1*, se realizó un análisis comparativo del proteoma de las plántulas de la línea mutante 8.1 respecto a las plántulas de la línea salvaje Col-0 mediante electroforesis bidimensional. Según este análisis, de entre los spots diferenciales
10 observados entre ambos genotipos se identificó un polipéptido, que tras un análisis por espectroscopia de masas de sus fragmentos de digestión con tripsina, se vio que correspondía a una de las isoformas del factor de inicio de la traducción 4E (eIF(iso)4E), el cual presentaba una baja acumulación en las plantulas de la línea mutante 8.1.

15 Los factores 4E e iso4E forman parte de los complejos 4F e iso4F respectivamente, siendo estos últimos exclusivos de plantas (Browning, *Plant Mol. Biol. Vol 32, pp. 107-144, 1996*). Estos complejos, formados por los factores 4A, 4G, 4E/iso4E y factores PABP, son requeridos junto a otros factores de iniciación para el inicio de la traducción de las proteínas, permitiendo la unión del mRNA al complejo de
20 preiniciación. En concreto, el factor de inicio de la traducción 4E tiene la función de reconocer y unirse a las estructuras CAP presentes en el extremo 5' de los mRNA.

 La baja representación del factor eIF(iso)4E en el mutante 8.1 parece indicar que *AtDBP1* contribuye positivamente a la acumulación de eIF(iso)4E. Con objeto de comprobar si el control que ejerce *AtDBP1* sobre dicho factor es a nivel transcripcional o post-transcripcional se analizó la expresión de eIF(iso)4E a nivel de mRNA mediante
25 RT-PCR y a nivel de proteína mediante Western-blot usando un anticuerpo policlonal específico. Los resultados obtenidos indican una menor acumulación de la proteína eIF(iso)4E en la línea mutante 8.1 al comparar con plantas Col-0 (Fig. 2A) mientras que el nivel de mRNA, analizado por RT-PCR es similar en ambos genotipos (Fig. 2B).

Por tanto, AtDBP1 debe afectar a la expresión de *eIF(iso)4E* a nivel post-transcripcional, lo que sugiere una posible interacción directa entre ambas proteínas.

AtDBP1 y eIF(iso)4E interactúan *in vivo*

Para comprobar si AtDBP1 es capaz de interactuar con eIF(iso)4E se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido usando fusiones traduccionales de ambas proteínas a los dominios de unión a DNA y de activación transcripcional, respectivamente, del activador de levadura GAL4. La expresión de AtDBP1 junto a eIF(iso)4E en levadura fue capaz de inducir la expresión del gen marcador *HIS3*, confirmándose así la interacción específica entre ambas proteínas (Fig. 3A). Una mutación puntual en el dominio C-terminal de AtDBP1 que reduce la actividad proteín-fosfatasa de la misma, debilitó de forma significativa la interacción, sugiriendo que la isoforma del factor de inicio de la traducción 4E podría ser un sustrato susceptible a la desfosforilación mediada por AtDBP1.

La interacción observada entre AtDBP1 y eIF(iso)4E se confirmó mediante coinmunoprecipitación. Utilizando un anticuerpo específico frente a eIF(iso)4E se detectó la presencia de dicho factor mediante Western blot en el inmunoprecipitado obtenido con anticuerpos monoclonales anti-HA a partir de extractos de plantas transgénicas que expresaban AtDBP1 fusionada al epítipo HA bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), de expresión constitutiva (Fig. 3B). Ello demuestra que ambas proteínas son capaces de interactuar en la planta *in vivo*.

La inhibición de la expresión de *AtDBP1* conduce a una pérdida de susceptibilidad o aumento de la resistencia a la infección por potyvirus

Se intentó establecer si los mutantes 8.1 muestran resistencia recesiva específica a potyvirus. Análisis por Western-blot revelaron que estos mutantes presentan niveles inferiores de eIF(iso)4E, de lo que se deduce que la pérdida de la función de este factor confiere resistencia frente a potyvirus. Aunque no se observó una ausencia total de la proteína eIF(iso)4E en la línea de inserción de T-DNA 8.1, la menor acumulación de eIF(iso)4E en estas plantas con respecto a las plantas Col-0 sugiere la posibilidad de que la ausencia de AtDBP1 (o pérdida de función) produzca

un fenotipo de resistencia a potyvirus. Por esta razón, se inocularon plantas Col-0 y plantas de la línea 8.1 con un clon infeccioso del Plum Pox Virus o virus de la sharka (PPV), miembro de la familia de los potyvirus. El clon viral utilizado además era portador del gen reportador GFP, lo cual permitía hacer un seguimiento *in vivo* del grado de colonización de la infección viral. Inicialmente se analizó la acumulación del RNA viral en tejido sistémico no inoculado mediante RT-PCR cuantitativa usando cebadores específicos para el gen marcador GFP. Como se muestra en la figura 4A, quince días después de la inoculación (dpi) se observa una acusada disminución en la acumulación del mRNA de GFP en plantas 8.1 frente a plantas Col-0. Este resultado guarda correlación con el nivel de proteína GFP detectada mediante Western-blot en tejido sistémico de ambos genotipos, donde se observa asimismo una menor acumulación de la proteína en plantas 8.1 al comparar con plantas Col-0 a los 15 dpi (Fig. 4B). El gen marcador GFP permite a su vez realizar un seguimiento del movimiento y distribución del virus mediante microscopia de fluorescencia. Ello ha puesto de manifiesto un marcado retraso del movimiento viral en las plantas 8.1 respecto a plantas Col-0, donde tanto la acumulación viral en el tejido vascular como el movimiento del virus a través del pecíolo hacia tejidos distales es más temprano (Fig.4C). Además, para cada uno de los tiempos analizados después de la inoculación, se observa que el tejido sistémico no inoculado analizado en las plantas Col-0 presenta una mayor invasión viral alcanzando casi toda la hoja, mientras que en el tejido equivalente en las plantas 8.1 la dispersión del virus afectaba predominantemente al tejido vascular. Por tanto, la pérdida de expresión y en consecuencia la pérdida de función de *AtDBP1* que presenta el mutante 8.1 ralentiza y atenúa la infección vírica.

Debido a la ausencia de síntomas en las infecciones con PPV, se analizó también la respuesta de plantas 8.1 frente a otro miembro de la familia de los potyvirus causante de síntomas en *Arabidopsis*, el *Turnip Mosaic Virus* (TuMV). Ello permitiría comprobar si la pérdida de susceptibilidad observada para el PPV podría extenderse a otros miembros de la familia. Como muestra la figura 5, la inoculación con TuMV provocó una sintomatología mucho menos severa en plantas 8.1 que la mostrada por plantas control Col-0. La sintomatología a la que hace referencia la figura 5 se podría precisar mediante el análisis visual solamente en hojas, al generarse en la planta

salvaje y no en la 8.1 por su especial resistencia, una inducción de clorosis y posterior necrosis que conlleva el colapso del tejido foliar consecuencia de la infección del tejido por el virus. En última instancia dicha clorosis y necrosis, si se trata de infecciones severas o gran título de virus, se extiende a todo el tejido foliar y eventualmente conlleva el colapso general de la planta; colapso y muerte de la planta que es característicos de infecciones patogénicas tan severas como la que estamos estudiando en este caso. Por tanto, la manipulación de la función de *AtDBP1* parece desencadenar un aumento en la resistencia o pérdida en la susceptibilidad a varios miembros de la familia de los potyvirus.

10

EXPOSICIÓN DETALLADA DE UN MODO DE REALIZACIÓN

Crecimiento de las plantas y método de inoculación vírica:

Como material vegetal se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh del ecotipo Col-0 y de la línea mutante 8.1, también en un fondo genético Col-0, que corresponde a la línea de inserción de T-DNA SALK_005240 del SALK Institute (La Jolla, EE.UU.). Las semillas de estas plantas se estratificaron durante 3 días a 4°C tras la imbibición. Posteriormente las plantas fueron crecidas en sustrato compactado Jiffy-7 (Clause-Tezier Iberica, Valencia, España) a 23°C con un fotoperiodo de 10 horas de luz y 14 de oscuridad. El inóculo empleado consistía en una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* portador de un clon infeccioso del virus PPV (Plum Pox Virus o virus de la sharka) con el gen marcador GFP. El cultivo bacteriano fue resuspendido en tampón MES 10 mM pH 5.6, Mg₂Cl 10 mM, acetosiringona 150 µM, a una densidad óptica a 600 nm de 0.5 y mantenido varias horas a temperatura ambiente. Plantas de cinco semanas de edad fueron inoculadas con 20 µl de dicho inóculo, infiltrando por el envés de la hoja la mitad distal de una hoja por planta. Posteriormente las plantas inoculadas se mantuvieron en las mismas condiciones de luz y temperatura para hacer un seguimiento de la infección vírica a diferentes tiempos.

Extracción y purificación de RNA

Para las extracciones de RNA se utilizó TriZol (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad e integridad del RNA extraído se analizó por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa.

5 Análisis de la expresión génica por RT-PCR

Para evaluar el grado de expresión de determinados genes se empleó la técnica de RT-PCR semicuantitativa. A partir de RNA total se obtuvo el correspondiente cDNA mediante transcripción inversa con oligodT usando el kit "Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" (Fermentas). El cDNA obtenido se utilizó como molde en reacciones de PCR con cebadores específicos para el gen de interés en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler. Los productos finales se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Los cebadores utilizados (Seq. Id. No. 1 a 6) se muestran en la Tabla 1:

TABLA 1

Gen	Secuencia de los cebadores	Número de ciclos	Seq. Id. No.
<i>AtDBP1</i>	Directo: 5'-GTCTGAGTTTGTTCCTGCTACG- 3'	27	1
	Reverso: 5'-TACTGCTCATGGGTTTGTGGTC- 3'		2
<i>eIF(iso)4E</i>	Directo: 5'- CGTCTCAGAAGAAACTCAACTGC- 3'	24	3
	Reverso: 5'-CATCTTCCTCTGGCTTCACACTC- 3'		4
<i>eEF1</i> □	Directo: 5'- GCACAGTCATTGATGCCCA- 3'	18	5
	Reverso: 5'- CCTCAAGAAGAGTTGGTCCCT- 3'		6

PCR en tiempo real

- 5 Las muestras fueron analizadas por triplicado y las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron usando Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en un detector de secuencias ABI PRISM 7000. Los cebadores directo y reverso fueron diseñados usando el paquete informático Primer express. Las secuencias de los cebadores utilizados (Seq. Id. No 7 y 8) se muestran en la Tabla 2:

TABLA 2

Gen	Secuencia de los cebadores	Seq. Id. No.
<i>GFP</i>	Directo: 5'- ACGTAAACGGCCACAAGTTC- 3'	7
	Reverso: 5'- AAGTCGTGCTGCTTCATGTG- 3'	8

Sistema de doble híbrido en levadura

- 5 Con objeto de determinar si el factor eIF(iso)4E es capaz de interactuar de forma específica con AtDBP1 se utilizó el sistema de doble híbrido en levadura. Para ello se generaron fusiones traduccionales de AtDBP1 al dominio de unión a DNA del activador de levadura GAL4 y de eIF(iso)4E al dominio de transactivación del mismo activador. Las dos proteínas de fusión se expresaron en la cepa de levadura PJ69-4A
- 10 y se analizó la expresión del gen marcador *HIS3*, evaluando el crecimiento de la cepa de levadura transformada con ambas construcciones en medio sin histidina y suplementado con 3-amino-triazol, un inhibidor competitivo de la enzima HIS3, frente a cepas control.

REFERENCIAS

- Agrios, "Chapter 14: Plant diseases caused by viruses" (1988), *Plant Pathology*, 3rd Ed., San Diego, CA, Academic Press, p.655.
- 5 • Baldi, P., Patocchi, A., Zini, E., Toller, C., Velasco, R. and Komjanc, M. (2004). Cloning and linkage mapping of resistance gene homologues in apple. *Theor. Appl. Genet.* **109**, 231-239.
- Baulcombe, D. (2005). RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 290-293.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- 10 • Boevnik, P. and Oparka, K.J. (2005). Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiol.* **138**, 1815-1821.
- Browning, K.S. (1996). The plant translational apparatus. *Plant Mol. Biol.* **32**, 107-144.
- 15 • Carrasco, J.L., Ancillo, G., Mayda, E., and Vera, P. (2003). A novel transcription factor involved in plant defense endowed with protein phosphatase activity. *EMBO J.* **22**, 3376-3384.
- Carrasco, J.L., Ancillo, G., Castelló, M.J. and Vera, P. (2005). A novel DNA-binding motif, hallmark of a new family of plant transcription factors. *Plant Physiol.* **137**, 602-606.
- 20 • Carrasco, J.L., Castelló, M.J. and Vera, P. (2006). 14-3-3 mediates transcriptional regulation by modulating nucleocytoplasmic shuttling of tobacco DNA-binding protein-phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* **281**, 22875-22881.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. and Schaad, M.C. (1996). Cell-to-cell and long distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8**, 1669-1681.

- Chen, M.-H., Tian, G.-W., Gafni, Y. and Citovsky, V. (2005). Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant Physiol.* **138**, 1866-1876.
- Dempsey, D.A., Shah, J. and Klessig, D.F. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, 547-575.
- 5 • Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K.S. and Robaglia, C. (2002). The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso) 4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.* **32**, 927-934.
- Deng, Z., Huang, S., Ling, P., Chen, C., Yu, C., Weber, C.A., Moore, G.A. and Gmitter, F.G. (2000). Cloning and characterization of NBS-LRR class
10 resistance-gene candidate sequences in citrus. *Theor. Appl. Genet.* **101**, 814-822.
- Di Gaspero, G. and Cipriani, G. (2002). Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). *Theor. Appl. Genet.* **106**, 163-172.
- 15 • Díaz-Pendón, J.A., Truniger, V., Nieto, C., García-Mas, J., Bendahmane, A. and Aranda, M. (2004). Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol. Plant Pathol.* **5**, 223-233.
- Dineshkumar, S.P., Whitham, S., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B. (1995). Transposon tagging of tobacco mosaic virus resistance gene N: its
20 possible role in the TMV-N-mediated signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4175-4180.
- Dondini, L., Costa, F., Tataranni, G., Tartarini, S. and Sansavini, S. (2004). Cloning of apricot RGAs (Resistance Gene Analogs) and development of molecular markers associated with sharka (PPV) resistance. *J. Horticult. Science and Biotech.* **79**, 729-734.
25
- Fraser, R.S.S. (1990). The genetics of resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**, 179-200.

- Fraser, R.S.S. (1999). Plant resistance to viruses. In: *Encyclopedia of Virology* (Granoff A. and Webster, R.G., eds). Academic Press, pp. 1300-1307. San Diego, CA.
- 5 • Hagiwara, Y., Komoda, K., Yamanaka, T., Tamai, A., Meshi, T., Funada, R., Tsuchiya, T., Naito, S. and Ishikawa, M. (2003). Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. *EMBO J.* **22**, 344-353.
- Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*. Academic Press.
- 10 • Ishikawa, M., Naito, S. and Ohno, T. (1993) Effects of the *tom1* mutation of *Arabidopsis thaliana* on the multiplication of Tobacco mosaic virus RNA in protoplasts. *J. Virol.* **67**, 5328-5338.
- Ishikawa, M., Obata, F., Kumagai, T. and Ohno, T. (1991). Isolation of mutants of *Arabidopsis thaliana* in which accumulation of Tobacco mosaic virus coat protein is reduced to low levels. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 33-38.
- 15 • Kreps, J.A., Yajun, W., Chang, H.-S., Zhu, T., Wang, X. and Harper, J.F. (2002). Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* **130**, 2129-2141.
- Lartey, R., Ghoshroy, S. and Citovsky, V. (1998). Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutation (*vsm1*) tha restricts systemic movement of tobamoviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 706-709.
- 20 • Lellis, A.D., Kasschau, K.D., Whitham, S.A. and Carrington, J.C. (2002). Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr. Biol.* **12**, 1046-1051.
- Maule, A.J., Leh, V. and Lederer, C. (2002). The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 279-284.
- 25

- Mayda, E., Marqués, C., Conejero, V., and Vera, P. (2000). Expression of a pathogen-induced gene can be mimicked by auxin insensitivity. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 23-31.
- 5 • Murphy, J.F., Rhoads, R.E., Hunt, A.G. and Shaw, J.G. (1990). The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase. *Virology* **178**, 285-288.
- 10 • Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M.P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. and LeGall, O. (2003). The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. *Plant Physiol.* **132**, 1272-1282.
- Ohshima, K., Taniyama, T., Yamanaka, T., Ishikawa, M. and Naito, S. (1998). Isolation of a mutant of *Arabidopsis thaliana* carrying two simultaneous mutations affecting *Tobacco mosaic virus* multiplication within a single cell. *Virology* **243**, 472-481.
- 15 • Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T. and Maule, A.J. (1999). New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 367-376.
- Ritzenthaler, C. (2005). Resistance to plant viruses: old issue, news answers? *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 118-122.
- 20 • Robaglia, C. and Caranta, C. (2006). Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.* **11**, 40-45.
- Ruffel, S., Dussault, M.H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. and Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against *Potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* **32**, 1067-1075.
- 25 • Sanford, J.C. and Johnston, S.A. (1985). The concept of parasite-derived resistance: driving resistance genes from the parasites own genome. *J. Theor. Biol.* **115**, 395-405.

- Shen, K.A., Meyers, B.C., Islam-Faridi, M.N., Chin, D.B., Stelly, D.M. and Micheltore, R.W. (1998). Resistance gene candidates identified using PCR with degenerate primers map to resistance genes clusters in lettuce. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 815-823.
- 5 • Simon, L., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M.G. and Laliberté, J.-F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J. Virol.* **74**, 7730-7737.
- 10 • Soriano, J.M., Vilanova, S., Romero, C., Yacer, G. and Badenes, M.L. (2005). Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.) *Theor. Appl. Genet.* **110**, 980-989.
- Stange, C. (2006). Plant-virus interactions during the infective process. *Cien. Inv. Agr.* **33**, 1-18.
- 15 • Tsujimoto, Y., Numaga, T., Ohshima, K., Yano, M., Ohsawa, R., Goto, D., Naito, S. and Ishikawa, M. (2003). *Arabidopsis tobamovirus multiplication* (TOM) 2 locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. *EMBO J.* **22**, 335-343.
- Vance, V. and Vaucheret, H. (2001). RNA silencing in plants-defense and counterdefense. *Science* **292**, 2277-2280.
- 20 • Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to TOLL and the Interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101-1115.
- Whitham, S., McCormick, S. and Baker, B. (1996). The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8776-8781.
- 25 • Whitham, S., Yamamoto, M. and Carrington, J. (1999). Selectable viruses and altered susceptibility mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 772-777.

- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M.G. and Laliberté, J.F. (1997). Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**, 84-92.
- 5 • Yamanaka, T., Imai, T., Satoh, R., Kawashima, A., Takahashi, M., Tomita, K., Kubota, K., Meshi, T., Naito, S. and Ishikawa, M. (2002). Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *J. Virol.* **76**, 2491-2497.
- 10 • Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S. and Ishikawa, M. (2000). TOM1, an Arabidopsis gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10107-10112.
- 15 • Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S., Ishikawa, M. (2004). The Arabidopsis cucumovirus multiplication 1 and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G. *J. Virol.* **78**, 6102.
- Yoshii, M., Yoshioka, N., Ishikawa, M., and Naito, S. (1998a). Isolation of an *Arabidopsis thaliana* mutant in which accumulation of Cucumber mosaic virus coat protein is delayed. *Plant J.* **13**, 211-219.
- 20 • Yoshii, M., Yoshioka, N., Ishikawa, M. and Naito, S. (1998b). Isolation of an *Arabidopsis thaliana* mutant in which the multiplication of both *Cucumber mosaic virus* and *Turnip crinkle virus* is affected. *J. Virol.* **72**, 8731-8737.

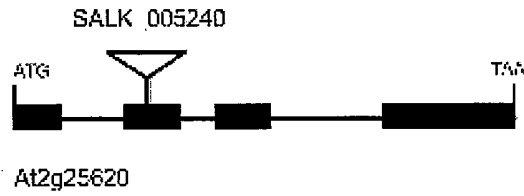
REIVINDICACIONES

1. Uso del gen AtDBP1 en especies vegetales como regulador de la respuesta de las plantas frente a la infección por potyvirus.
- 5 2. Uso del gen AtDBP1 según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha regulación consiste en conferir resistencia o un aumento de resistencia a la infección por potyvirus comparada con las plantas de tipo salvaje.
3. Uso del gen AtDBP1 según las reivindicaciones 1-2, caracterizado porque la resistencia o mayor resistencia a la infección por potyvirus se produce por pérdida de función del gen AtDBP1.
- 10 4. Uso del gen AtDBP1 según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la pérdida de función es por inhibición de su expresión.
5. Uso del gen AtDBP1 según las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque la inhibición de su expresión es producida por la mutación 8.1.
- 15 6. Uso del gen AtDBP1 según las reivindicaciones 1-5, caracterizado por producir una menor acumulación de eIF(iso)4e.
7. Uso del gen AtDBP1 según las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el potyvirus es Plum Pox Virus (PPV).
8. Uso del gen AtDBP1 según las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el potyvirus es Turnip Mosaic Virus (TuMV).
- 20 9. Uso del gen AtDBP1 según las reivindicaciones 1 -8, para la obtención de plantas transgénicas resistentes o que presenten mayor resistencia a la infección por potyvirus.
- 25 10. Plantas transgénicas resistentes o que presenten mayor resistencia a la infección por potyvirus obtenidas según reivindicación 9 caracterizadas por su pérdida de función del gen AtDBP1.

11. Planta modificada genéticamente según reivindicación 10 caracterizada porque la pérdida de función del gen AtDBP1 es producida por la mutación 8.1.

FIGURA 1

A



B

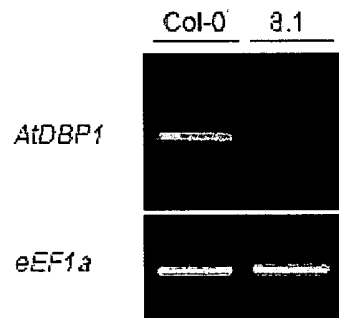
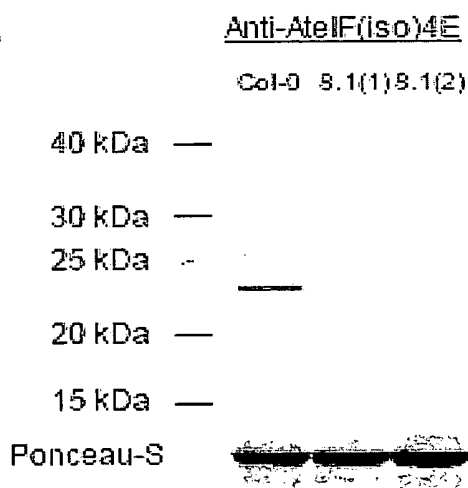


FIGURA 2

A



B

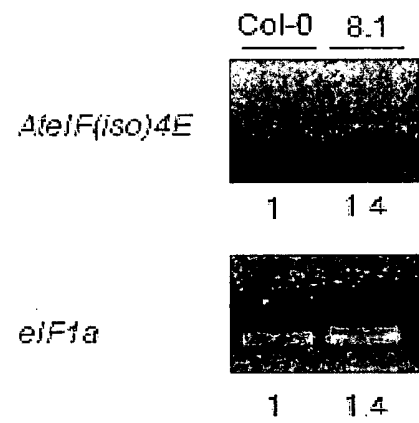
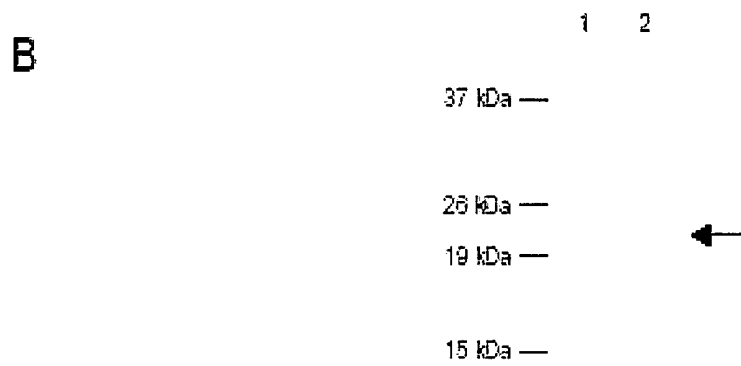
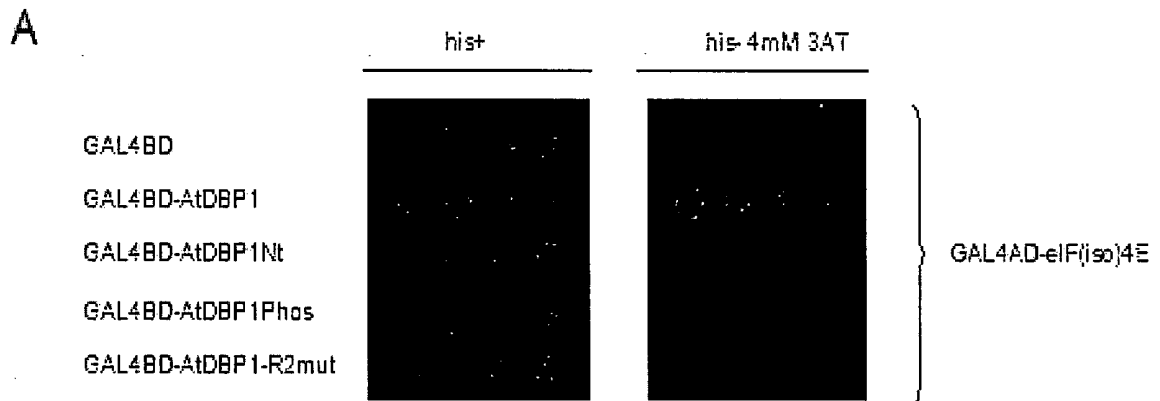


FIGURA 3



3/7

FIGURA 4

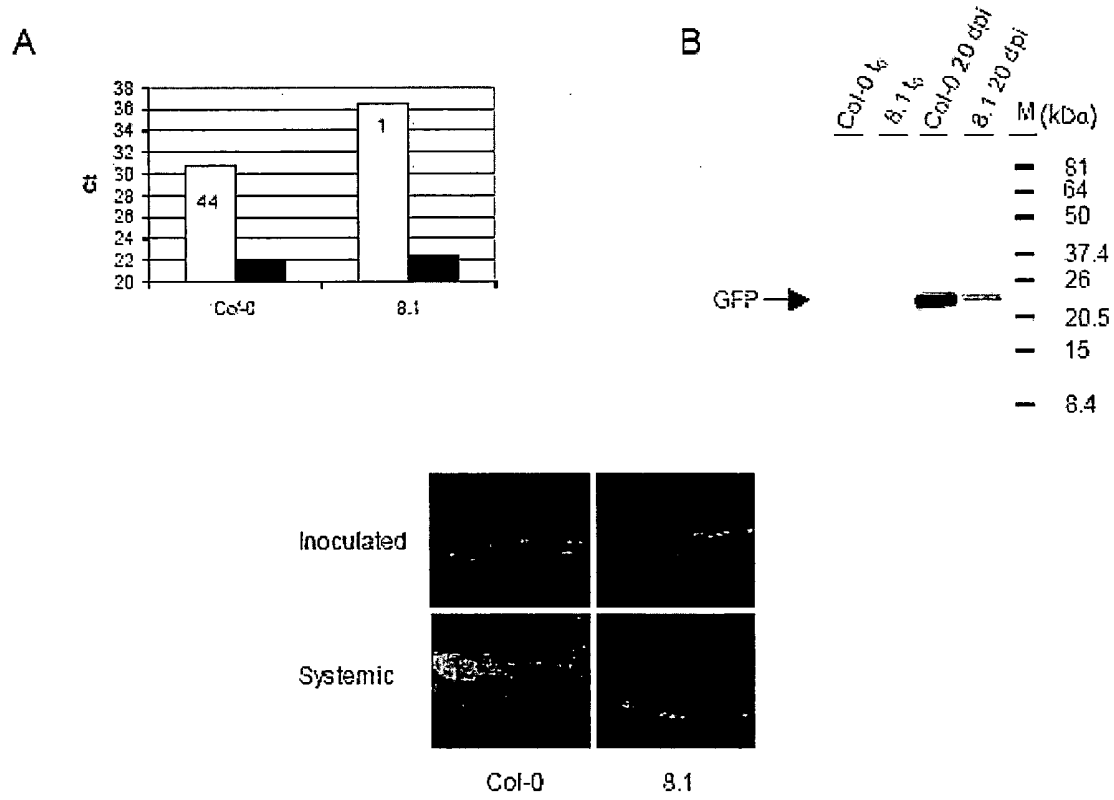
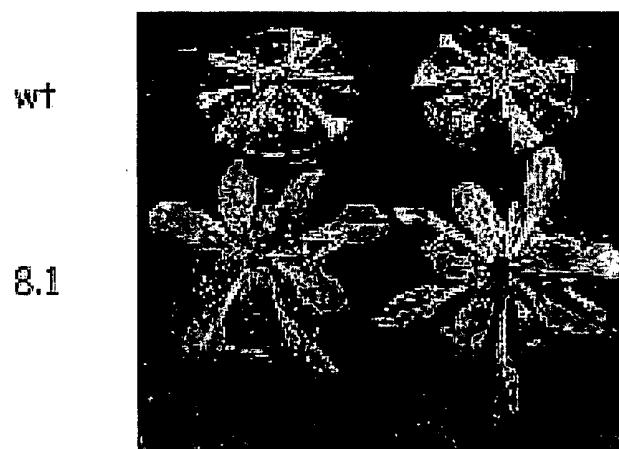


FIGURA 5



4/7

FIGURA 6

Secuencia nucleotídica del gen AtDBP1 (At2g25620)

gccggcgaacagttttattatctctctttctgctgttccaattctccacaaaaccctaattttctctaaacctgaaattcgtgtaaccttc
 aacaatctctcaattttgtttcgaattcgaatccattgtttacgaatctctcatctaaagctacattctcgttaaactcgttttaactgactcgtc
 actcgtgagtgactcgtcagctgtttccataattgcttattgaattttatacgaatgatttcaat**ATGGAAGAACTAGAGGAA**
TTTCTGATCCAGAGAATGGGAGTTCGAGTTACGGCGGTAACCGCCGAATCCACTCTCCT
TCTCTTCTCCTCCGCCGCTGCTGCCGTTACAGGCAAACCTTCGACGGCGAGCGATCGTT
GGCGCGTGTAAATAAGAGGTCCTGTTGACACTCATCTCTCgtaagattcgtttcttcaacttgattg
 tggatcagttaggttatgtgtattgaatgatcaaftaagttgaggtttgtaattattgctcgtttggattgatcattattggttccaatgt
 gtataaataaggtagaagttctgttttaattgttcattatgagatgttgaggtttctgattgatttcaattttgtag**GTGAAGACAAT**
GGTGTGAGATATATCTGTTGAGAATGAGTTTACTATAGAGAAGAACAAGTCTGAGTTTGT
CCTGCTACGCGTTCTGGAGCTTGGTCTGATATTGGCTCCAGGTCAAGCATGGAAGATGCTT
ATCTATGCGTTGATAATTTTCATGGATAGCTTTGGCCTTCTGAATTCTGAGGCTGGTCCAAGT
GCCTTCTATGGGgtatgttcttctcagtttctgattttgtagattgtagcataagcaacaactgtaagttagtgaaaatg
 gggatctcttattgaattttgtttattag**GTATTTGATGGACATGGTGGGAAGCATGCCGCTGAGTTTGCA**
TGTCACCATATACCGAGGTACATTGTTGAAGATCAAGAGTTTCCTAGTCAAATCAATAAGG
TGTTATCTTCAGCATTCTTCAAACAGACACTGCCTTCTTAGAGGCGTGTTCATTGGATGG
GAGCCTTGCTTCAGGAACTACTGCTTTGGCAGCTATTCTTTTTGGAAGgtttgttgattcaactcttattat
 ctlttaglttgctaacctaaactctacatcttggtatgttaagaaaaacgtgtttgggaatagatgctatcctcaactcgttagtgat
 aatcttgaccttaacacaatcatgtacaactaattcgctgtagatgtattctctgccatagtgtcgtctataatgattattgtctcatat
 ggtcttgagtcacgtatataactgctcattcactctatttagattctggtatgaaaccgtttggtaccgtttaacatagttttgtgtaaca
gGTCGTTGGTGGTAGCAAACGCTGGAGATTGCAGAGCAGTCTTATCCCGTCAGGGAAAAG
CCATTGAAATGTCAAGAGACCACAAACCCATGAGCAGTAAGGAAAGGAGACGCATTGAA
GCATCGGGTGGACATGTATTTCGATGGCTATCTAAATGGACAACCTTAATGTGGCTCGAGCG
CTAGGTGACTTTCATATGGAAGGCATGAAGAAGAAGAAAGATGGTTCTGATTGTGGACCT
CTAATTGCAGAGCCTGAGCTCATGACAACAAAACCTAACAGAAGAGGATGAGTTCCTTATA
ATTGGGTGTGACGGGTTTGGGATGTGTTTCATGAGCCAGAATGCTGTAGATTTTGCCAGA
AGGAGACTACAGGAGACAATGACCCGGTCATGTGTAGTAAGGAGCTGGTTGAGGAAGC
TTTGAAGAGGAAGAGTGCTGATAATGTGACGGCAGTGGTTGTGTGTCTTCAGCCACAGCC
ACCACCGAACTTGGTAGCGCCGAGTTGAGAGTTCACAGAAGCTTCTCGGCGGAGGGTTT
AAAAGATTTACAGAGCTACTTGGATGGCTTGGGAAAC**TAA**ttggggacatgaggatggtgacgaatgat
 tgatttctgtttttgttttcttacaattttatagttgggtttggaggtttgtctgttaaattctcgaatttgagtaagtataacatgagg
 cggcacaataaattattgttgtaggatataattttgtcactttgcataataataattctgctcagct

5/7

FIGURA 7

Secuencia nucleotídica del gen AtDBP1 (At2g25620) en el mutante 8.1 (SALK_005240)

gccggcgaacagtttattatctctctcttctcgtgtccaatttctccacaaaaccctaatttctctaaaccctgaaattcgtgtaaccttc
 aacaatctctcaattttgtttcgattctgaatccattgtttacgaatctctcatctaaagctacattctcgttaaactggttttaactgactcgc
 actcgtgagttgactcgcagcgtttccataattgcttattgaattttatacagatgatgttcaat**ATG**G AAGAACTAGAGGAA
 TTTCTGATCCAGAGAATGGGAGTTCGAGTTACGGCGGTAAACCGCCGAATCCACTCTCCT
 TCTCTTCTCCTCCGCCGCTGCTGCCGTTACAGGCAAACCTTCGACGGCGAGCGATCGTT
 GCGGCCGTGTAATAAGAGGTCCTGGTTCGACACTCATCTCTCgtaagattcgtttctctcaactgattg
 tggatcagttaggtttattttgtattgaatgatcaatttaagttgaggttttgaattattgctcgtctttggattgatcattattggttcctaagt
 gtataattaaggtagaagtttctgttttaagtgtcattatgagatgtttgaggttttctgattgatttccattttgtag**GTGAAGACAAT**
 GGTGTCAGATATATCTGTTGAGAAATGAGTTTACTATAGAGAAGAACAAGTCTGAGTTTGT
 CCTGCTCCTGTGGTTGGCATGCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTTTCACGCCCTT
TAAATATCCGATTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTGT
CAAACACTGATAGTTTAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCATGAGCGGAGAATTA
GGGAGTCACGTTATGACCCCGCCGATGACGCGGGACAAGCCGTTTTACGTTTGAAGTGA
CAGAACCGCAACGTTGAAGGAGCCACTCAGCCGCGGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAGC
ACATACGTCAGAAACCATTATTGCGCGTTCAAAGTGCCTAAGGTCACACTATCAGCTAGCAA
ATATTTCTTGCAAAAATGCTCCACTGACGTTCCATAAATCCCCTCGGTATCCAATTAGAGT
CTCATATTCCTCTCAATCCAAATAATCTGCACCGGATCTGGATCGTTTCGCATGATTGAACA
AGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGACTG
GGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCG
CCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCA
GCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTC
ACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCA
TCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATA
CGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGC
TACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGCATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTC
GCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGATGATCTCGTC
GTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCC
GTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGCTTTACGGTAT
CGCCGCTCCCGATTCCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGCG
GGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGA
TCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGG

ATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACGGGATCTCTGCGGAAC
AGGCGGTCTGAAGGTGCCGATATCATTACGACAGCAACGGCCGACAAGCACAACGCCACGA
TCCTGAGCGACAATATGATCGGGCCCCGGCTCCACATCAACGGCGTTCGGCGGGGACTGCC
CAGGCAAGACCGAGATGCACCGCGATATCTTGCTGCGTTCCGATATTTTCGTGGAGTTCCC
GCCACAGACCCGGATGATCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGA
ATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAA
TAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAAT
TATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCG
CGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGCCTCCTGTCAATGCTGGCGGGCGGCTCTGGTGGTG
GTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGC
TCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGG
CAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGC
TAAAGGCAAACCTTGATTCTGTGCGTACTGATTACGGTGTCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTG
ACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATCCCAA
ATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCT
TCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCCCAATACGCAAACCGCCTCT
CCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCG
GGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTAC
ACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGA
AACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCCCAGATTAGCCTTTTC
AATTCAGAAAGAATGCTAACCCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCAGGTCTCATCAA
GACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAATACCTTCCCAAGAAGGTTAAAGATG
CAGTCAAAGATTGAGGACTAAGTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATATTTCTCAAGATCA
GAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTCACAAACCAAGGCAAGTAATAGAG
ATTGGAGTCTCTAAAAAGGTAGTTCCCACTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTCAAAT
AGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTCTTACGA
CTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGCTACTCCAA
AAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAA
TATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTG
GAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAG
ATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAA
AAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTA
AGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATT
TCATTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCCC
GATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATG
ATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGT

TATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAA
ACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT
CGGAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAA
CTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCA
CCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCC
CTTCTTTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCGCCGTCGAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTA
GGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTC
ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTCGCGTTGGAGTCCACGTTT
TTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTT
GATTTATAAGGGATTTTGCAGTTTCGGAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCTGCTGGGG
CAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAG
CTGTTGCCCGTCTCACTGGTAAAAGAAAAACCACCCAGTACATTAATAAACGTCGCAATG
TGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATATATCTACGCGTTCTGGAGC
TTGGTCTGATATTGGCTCCAGGTCAAGCATGGAAGATGCTTATCTATGCGTTGATAAATTC
ATGGATAGCTTTGGCCTTCTGAATTCTGAGGCTGGTCCAAGTGCCTTCTATGGGgatgttcttctt
cagtttctgatTTTTgtagattgtagcataagcaacaactgtgaatgtagtgaaaataggggatctcttattgaatttgttattagG
TATTTGATGGACATGGTGGGAAGCATGCCGCTGAGTTTGCATGTCACCATATACCGAGGT
ACATTGTTGAAGATCAAGAGTTTCTAGTGAAATCAATAAGGTGTTATCTTCAGCATTCTT
CAAACAGACACTGCCTTCTTAGAGGCGTGTTTATTGGATGGGAGCCTTGCTTCAGGAACT
ACTGCTTTGGCAGCTATTCTTTTTGGAAGgtttgttgattcaactcttattatcttttagtttgtctaacctaaactctacat
cttggtatgttaaagaaaaacgtgttgggaatagatgcttactcaactgcgtagtgcataatcttgaccttaacacaatcatgtaca
actaatccgctgtagatgtattctctgcccatatgtgctgctgctataatgtattgtctcatatggtctttgagtcacgtatataactgctcatt
tcatacttattagattctggtatgaaaccgttggtagccgtgttaacatagtttggtaacag**GTCGTTGGTGGTAGCAA**
ACGCTGGAGATTGCAGAGCAGTCTTATCCCGTCAGGGAAAAGCCATTGAAATGTCAAGAG
ACCACAAACCCATGAGCAGTAAGGAAAGGAGACGCATTGAAGCATCGGGTGGACATGTA
TTCGATGGCTATCTAAATGGACAACCTAATGTGGCTCGAGCGCTAGGTGACTTTCATATGG
AAGGCATGAAGAAGAAGAAAGATGGTTCTGATTGTGGACCTCTAATTGCAGAGCCTGAGC
TCATGACAACAAAACCTAACAGAAGAGGATGAGTTCCTTATAATTGGGTGTGACGGGGTTT
GGGATGTGTTTCATGAGCCAGAATGCTGTAGATTTTGCCAGAAGGAGACTACAGGAGCACA
ATGACCCGTCATGTGTAGTAAGGAGCTGGTTGAGGAAGCTTTGAAGAGGAAGAGTGCTG
ATAATGTGACGGCAGTGGTTGTGTGCTTCAGCCACAGCCACCACCGAACTTGGTAGCGC
CGAGGTTGAGAGTTCACAGAAGCTTCTCGGCGGAGGGTTTAAAAGATTTACAGAGCTACT
TGGATGGCTTGGGAAACTAAttgggggacatgaggatggtgacgaatgattgattctctgttttggttgtctttctacaat
atagttgggttggaggtttgtctgttaaattctcgcaatttgagtaagttataacaatgaggcggcatacaataattattgttggtaggat
atatttttgcactttgcataataataattctgcttcagtct

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 2008/000595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

C12N, A01H

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES,EPODOC,INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, TXTAU1, TXTEP1, TXTCA1, TXTGB1, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTW01, AGRICOLA, ANTE, BIOTECHNO, CABA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	11.08.2006, CARRASCO J.L. et al. 14-3-3 Mediates Transcriptional Regulation by Modulating Nucleocytoplasmic Shuttling of Tobacco DNA-binding Protein Phosphatase-1. Journal of biological chemistry. Vol.281, N° 32, pages 22875-22881	1-11
A	WO 03/066900 A2 (GENOPLANTE-VALOR) 14.08.2003. Abstract .	1-11
A	US 5589612 A (JILKA JM.et al.) 31.12.1996.Abstract.	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>“E” earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search

15 January 2009 (15.01.2009)

Date of mailing of the international search report

(27/01/2009)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

I.Rueda Molins

Telephone No. +34 91 349 32 79

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2008/000595

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03066900 A2	14.08.2003	FR 2835698 A FR 2835849 A,B AU 2003222893 A EP 1472374 A ZA 200406140 A MXPA 04007718 A US 2005255455 A JP 2006503544 T NZ 534545 A	15.08.2003 15.08.2003 02.09.2003 03.11.2004 01.04.2005 08.06.2005 17.11.2005 02.02.2006 30.06.2008
US 5589612 A	31.12.1996	NONE	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2008/000595

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/29 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 2008/000595

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

C12N, A01H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, TXTAU1, TXTEP1, TXTCA1, TXTGB1, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTW01, AGRICOLA, ANTE, BIOTECHNO, CABA

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	11.08.2006, CARRASCO J.L. et al. 14-3-3 Mediates Transcriptional Regulation by Modulating Nucleocytoplasmic Shuttling of Tobacco DNA-binding Protein Phosphatase-1. Journal of biological chemistry. Vol.281, N° 32, páginas 22875-22881	1-11
A	WO 03/066900 A2 (GENOPLANTE-VALOR) 14.08.2003. Resumen.	1-11
A	US 5589612 A (JILKA JM.et al.) 31.12.1996.Resumen.	1-11

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

15 Enero 2009 (15.01.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

27 de Enero de 2009 (27/01/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

I.Rueda Molins

N° de teléfono +34 91 349 32 79

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2008/000595

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 03066900 A2	14.08.2003	FR 2835698 A FR 2835849 A,B AU 2003222893 A EP 1472374 A ZA 200406140 A MXPA 04007718 A US 2005255455 A JP 2006503544 T NZ 534545 A	15.08.2003 15.08.2003 02.09.2003 03.11.2004 01.04.2005 08.06.2005 17.11.2005 02.02.2006 30.06.2008
US 5589612 A	31.12.1996	NINGUNO	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2008/000595

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/29 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)