

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-019943-00000-0000

Fecha: 2012-02-06 11:26:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 69

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO METODO PARA INCREMENTAR LA RESISTENCIA DE UNA PLANTA O PARTE
DE ELLA A UN AGENTE PATOGENO METODO PARA DETECTAR LA RESISTENCIA
DE UNA PLANTA O PARTE DE ELLA A UN AGENTE PATOGENO Y APLICACIONES
DE LOS MISMOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE WAGENINGEN UNIVERSITEIT

DOMICILIO WAGENINGEN, NETHERLANDS

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
.C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-019943- -00000-0000

Fecha: 2012-02-06 11:26:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 69

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **WAGENINGEN UNIVERSITEIT**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de los Países Bajos.

Dirección: Costerweg 50,
NL-6701 BH Wageningen,
Países Bajos

Domicilio: Wageningen,
Países Bajos

IDENTIFICACIÓN

C.C.☐

C.E.☐

NIT☐

Otro☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.☒

C.E.☐

NIT☐

Otro☐

Cual

Número 35.456.344

T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. Peter Jozef Gerard Marie DE WIT
Ericalaan 9,
NL-3911 XM Rhenen,
Países Bajos

2. Ioannis STERGIOPOULOS
Marijkeweg 28-3C-8,
NL-6709 PD Wageningen,
Países Bajos

3. Gerrit Haatje Jan KEMA
Bergweg 41,
NL-3904 HM Veenendaal,
Países Bajos

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/NL2010/050433 Fecha: 07 de julio de 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/005090 A1 Fecha: 13 de enero de 2011

6

Título (54)

MÉTODO PARA INCREMENTAR LA RESISTENCIA DE UNA PLANTA O PARTE DE ELLA A UN AGENTE PATÓGENO, MÉTODO PARA DETECTAR LA RESISTENCIA DE UNA PLANTA O PARTE DE ELLA A UN AGENTE PATÓGENO Y APLICACIONES DE LOS MISMOS

7

Clasificación Internacional (51) C07K 014/415

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI☒ NO☐

EP

08 de julio de 2009

09164957.4

9	Comprobante de pago No.: <u>12-006168</u>	Fecha: <u>23 de enero de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-005035</u>	Fecha: <u>19 de enero de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-008183</u>	Fecha: <u>27 de enero de 2012</u>

10

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.oo.

☒

Comprobante de pago por 5 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$150.000.oo.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐

Poder de

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☐

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒

Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2011/005090 A1.

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐

Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12x12

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

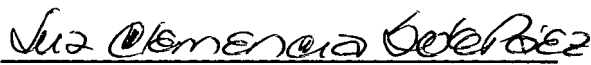
12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :



C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555



SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2011/005090 A1

Descripción:

Páginas 40 en español

Reivindicaciones: Número (s) 15

Figuras: Número (s) 7

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 January 2011 (13.01.2011)(10) International Publication Number
WO 2011/005090 A1(51) International Patent Classification:
C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/NL2010/050433(22) International Filing Date:
7 July 2010 (07.07.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09164957.4 8 July 2009 (08.07.2009) EP(71) Applicant (for all designated States except US): **WAGENINGEN UNIVERSITEIT** [NL/NL]; Costerweg 50, NL-6701 BH Wageningen (NL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DE WIT, Peter Jozef Gerard Marie** [NL/NL]; Ericalaan 9, NL-3911 XM Rhenen (NL). **STERGIOPOULOS, Ioannis** [GR/NL]; Marijkeweg 28-3C-8, NL-6709 PD Wageningen (NL). **KEMA, Gerrit Haatje Jan** [NL/NL]; Bergweg 41, NL-3904 HM Veenendaal (NL).(74) Agent: **Hatzmann, M.J.**; Verenigde, Johan de Wittlaan 7, NL-2517 JR Den Haag (NL).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR INCREASING THE RESISTANCE OF A PLANT OR A PART THEREOF TO A PATHOGEN, METHOD FOR SCREENING THE RESISTANCE OF A PLANT OR PART THEREOF TO A PATHOGEN, AND USE THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to the field of plant biotechnology. More in particular, the present invention relates to methods for increasing the resistance of a plant or part thereof that is susceptible to infection with a pathogen comprising an ortholog of the Avr4 protein of *Cladosporium fulvum*, wherein said plant is not a tomato or tobacco plant. The invention also relates to methods for screening the resistance of a plant or a part thereof to at least one pathogen, wherein said pathogen is not *Cladosporium fulvum*, wherein said plant is not a tomato plant. The invention further relates to the use of such methods.

WO 2011/005090 A1

Título: Método para incrementar la resistencia de una planta o parte de ella a un agente patógeno, método para detectar la resistencia de una planta o parte de ella a un agente patógeno y aplicaciones de los mismos.

5 INTRODUCCIÓN

La presente invención se relaciona al área de la biotecnología vegetal. En particular, la presente invención describe los métodos para incrementar la resistencia de una planta, o parte de ella, susceptible a infección por un patógeno
10 constituido de una región ortóloga de la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum*, la planta en mención no es de tomate. La invención también se relaciona con los métodos para detectar la resistencia de una planta, o parte de ella, a por lo menos un patógeno, la planta en mención no es de tomate. Además, la invención describe la aplicación de los métodos desarrollados.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las plantas agrícolas más importantes en el mundo, permanecen altamente susceptibles a patógenos que inducen enfermedades que pueden
20 afectar severamente su crecimiento y su tasa de reproducción. En algunos casos, inclusive la existencia misma de dichas plantas puede estar en peligro. Por ejemplo, una de las variedades líder de banana "Gros Michel" fue descubierta por el año 1820 y se cultivó para consumo en todo el mundo hasta 1920. La variedad "Gros Michel" fue completamente erradicada en pocas décadas por la enfermedad
25 de Panamá, causada por el hongo hifomiceto del suelo, *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. De hecho, se ha planteado la hipótesis que la variedad "Cavendish" sucesora de la "Gros Michel" podría llegar a ser no viable para cultivos en gran escala dentro de los próximos 10 a 20 años debido a una enfermedad similar. Igualmente, graves perspectivas se avizoran para otras plantas agrícolas
30 importantes en la agricultura como papa, maíz, soya y trigo.

Por lo tanto, debido a que los valores de producción de las plantas agrícolas son muy importantes para mantener el ritmo de la demanda mundial de alimentos, hay una gran necesidad en mejorar su resistencia a los patógenos. De estas plantas, las plantas de banano y de remolacha de azúcar comparten su

susceptibilidad a los patógenos de hongos, que pertenecen a la clase de Dothideomycetes.

El valor de producción de plantas de banano (*Musa ssp.*, incluyendo plátanos y otros tipos de bananos de cocción) sólo es seguido por el maíz, arroz y trigo. Anualmente, cerca de 100 millones de toneladas de bananos son producidos en unos 120 países en todo el mundo. Como mencionado anteriormente, los bananos son muy propensos a las infecciones por hongos. De estas infecciones, la enfermedad de Panamá y, más recientemente, la enfermedad de Sigatoka pertenecen a las más devastadoras. La enfermedad de Sigatoka incluye tres especies filogenéticamente relacionada con la familia de Dothideomycete de *Mycosphaerellaceae*, incluyendo *M. musicola*, *M. fijiensis* y la recientemente caracterizada *M. eumusae* (revisado en Jones 2000, 2003, Arzanlou *et al.* 2007). La enfermedad es una seria amenaza para las plantaciones de banano en todo el mundo, causando grandes pérdidas económicas. Las tres especies surgieron en los bananos durante el siglo pasado con *M. musicola* (causando la Sigatoka amarilla) que apareció por primera vez en el sureste de Asia en 1902 y sustituido gradualmente por *M. fijiensis* (causando la Sigatoka negra o raya negra de la hoja) que apareció en el valle de Sigatoka de las islas Fiji durante la década de 1960. La tercera especie, *M. eumusae*, causa la mancha Eumusae leaf spot y fue identificado como un nuevo constituyente del complejo Sigatoka en los bananos en 1990. En la actualidad la Sigatoka negra es la enfermedad más destructora de la plantación bananera en el mundo, reduciendo su producción a más del 38% (Marin *et al.* 1991).

La remolacha azucarera (*Beta vulgaris L.*) hace parte de la familia de Chenopodiaceae y representa el 30% de la producción mundial de azúcar. Como el trigo y el plátano, también es propenso a infección por hongos que pertenecen a la clase de Dothideomycetes. La especie *Cercospora beticola* es particularmente conocida por su capacidad a infectar a las remolachas azucareras. Las remolachas azucareras que han sido infectadas por el hongo *C. beticola* son fácilmente reconocidas por distintivas manchas redondas sobre la hojas que son a menudo rodeadas por un anillo de color rojo.

Otro tipo de planta que es comercialmente cultivada a gran escala y con tendencia a infección viral o de hongos es la planta de tabaco (género *Nicotiana*). La producción mundial de tabaco se proyecta que alcance más de 7,1 millones de toneladas de hoja de tabaco para 2010, es decir por encima de los 5,9 millones de

toneladas de 1997/99. Existen alrededor de unos 100 países productores de tabaco. Los mayores productores son China, India, Brasil, Estados Unidos, Turquía, Zimbabue y Malaui, quienes juntos proveen más del 80 por ciento de la producción mundial de tabaco. De estos productores, China por sí sola representa más del 35 por ciento de la producción mundial. Las plantas de tabaco también son susceptibles a infección de hongos por Dothideomycetes. Por ejemplo, la infección de las hojas de tabaco con *Cercospora nicotianae* es una de las causas principales de enfermedades de gran propagación en las plantas de tabaco, tales como la putrefacción y la mancha ojo de rana (frog-eye leaf spot).

Actualmente, los métodos para el control de estas enfermedades en las plantaciones comerciales se circunscriben principalmente en la aplicación abundante y repetitiva de fungicidas. En el pasado, los costes anuales en todo el mundo para estas aplicaciones se estimaban ya en unos 2,5 mil millones de dólares únicamente para el banano, lo que representaba en ese tiempo (una administración del) al 27% de los costes de producción de banano (Stover 1980, Stover y Simmonds 1987). Por lo que queda claro que este tipo de práctica no sólo es cara, sino que además representa una seria amenaza para la salud humana y animal y para el medio ambiente. Además, se ha demostrado que la aplicación intensiva de los fungicidas ha dado lugar al desarrollo de cepas resistentes a los hongos (Marín *et al.* 2003).

Por lo tanto, la invención de métodos alternativos para incrementar la resistencia de las plantas a sus patógenos es necesaria. Para esto se prefieren los métodos que evitan el uso de compuestos químicos como los fungicidas.

Tales métodos son conocidos en esta disciplina, como por ejemplo métodos para transformar genéticamente (plantas de) el banano (Crouch *et al.* 1998, Informe 1997, Sagi, 1997). Sin embargo estos métodos aún no han dado buenos resultados. Por lo tanto, la necesidad de mejorar la resistencia de las plantas agrícolas a sus agentes patógenos aún es vigente.

Las Dothideomycetes es una clase de los hongos ascomycete que comprende cerca de 50 familias, 650 géneros y 6.300 especies conocidas. Tradicionalmente muchos de sus miembros se incluían en el clado Loculoascomycetes. La clase contiene varios patógenos de plantas importantes, como *Stagonospora nodorum* (causando *Stagonospora* mancha de la hoja de los cereales), *Venturia inaequalis* (que causa costras en las hojas de muchas plantas como la de manzana y pera) y

las especies de *Ascochyta* (que causa manchas foliares en leguminosas como guisantes, garbanzos, judías y muchos otros).

El Cladosporium fulvum es un dothidiomycete biotrófico que causa el moho de la hoja de tomate (*Lycopersicon esculentum*). El *C. fulvum* secreta proteínas efectoras en el apoplasto de las plantas infectadas para facilitar el desarrollo de la enfermedad (Thomma et al. 2005). Estas proteínas efectoras pueden ser reconocidas por medio de proteínas de resistencia similares/cognado al *C. fulvum* (Cf) presentes en líneas de tomate resistente. La identificación por medio de las proteínas Cf provoca una rápida estimulación de respuesta de las defensas de la planta, caracterizada por la respuesta de hipersensibilidad (HR), a saber un tipo de muerte celular programada. Las células que rodean el sitio inicial de la infección mueren rápidamente y de esta manera, se puede prevenir un mayor crecimiento del hongo biotrófico (De Wit et al 2008;. Joosten & De Wit, 1999;. Thomma et al 2005).

Hasta la fecha, cuatro genes de avirulencia (Avr) han sido clonados a partir del agente *C. fulvum* y todos ellos codifican pequeñas proteínas ricas en cisteína secretadas durante la infección. Estas proteínas efectoras son las siguientes: Avr2, Avr4, Avr4E, y Avr9, cuya identificación en el tomate se realiza por medio de las proteínas de resistencia CF2, CF4, Cf4E y CF9, respectivamente (De Wit et al 2008;. Joosten & De Wit, 1999; Thomma et al. 2005). Cuatro proteínas extracelulares (Ecps) adicionales, llamadas Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5 han sido caracterizadas/detectadas a partir de *C. fulvum* que invocan una HR en las líneas de tomate portadores de un gen *Cf-Ecp* similar (De Kock et al 2005;. Lauge et al. 2000). Recientemente, también se han reconocido a las proteínas efectoras Ecp6 y Ecp7, sin embargo hasta ahora no existen líneas de tomate portadores de genes *Cf-Ecp*, que moderen su reconocimiento (Bolton et al. 2008).

Aunque demostrado por sólo unos pocos, todos las Avrs y Ecps son considerados como factores de virulencia (Bolton et al 2008;. Thomma et al 2005; Esse van et al 2007; Van Esse et al 2008). El efector Avr2 inhibe proteasa cisteína de la planta extracelular, incluyendo Rcr3, Pip1, "aleurian" y TDI6 (Krüger et al 2002; Rooney et al 2005;. Shabab et al. 2008.). Las cepas de *C. fulvum* productora de Avr2 provocan HR en las líneas de tomate portadoras de *Rcr3* y de genes de resistencia *Cf-2* (Dixon et al. 1996; Luderer et al. 2002b). El efector Avr4 es una proteína de quitina vinculante que protege la pared celular del hongo contra los

efectos nocivos de la quitanasa vegetal (van den Burg *et al.* 2006; van den Burg *et al.* 2004; van den Burg *et al.* 2003).

Las plantas de tomate que llevan el cognado gen de resistencia *Cf-4* reconocen el Avr4 produciendo cepas de *C. fulvum* e inician una HR (Joosten *et al* 1994;. Joosten *et al* 1997, Westerink *et al* 2004.). La secuencia de aminoácidos del gen *Cf-4* de tomate es revelado en WO 96/35790, junto con la secuencia de aminoácidos codificado de Cf4. WO 96/35790 también describe un método para incrementar la resistencia de una planta al *C. fulvum*, transformando la planta con una secuencia de ácido nucleico que codifica el gen *Cf-4*, proporcionando a la planta con proteínas Cf4 que reconocen la proteína efectora Avr4. Sin embargo, como el método confiere un planta con resistencia a cepas de *C. fulvum* que producen Avr4, su aplicación se limita a plantas susceptibles a infección **de/por** *C. fulvum*, como una planta de tomate o de tabaco. Este método no es el apropiado para incrementar la resistencia de plantas susceptibles a otros patógenos que el de *C. fulvum*, i.e. plantas tales como las de: banano, remolacha azucarera, tabaco, maíz y apio. Por lo tanto, un método para incrementar la resistencia a patógenos de plantas otras que la de tomate sigue siendo algo extremadamente necesario.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método. Proporciona un método para incrementar la resistencia de una planta o parte de ella susceptible a infección por un patógeno constituido de una región ortóloga de la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum*; dicho método comprende la transformación de dicha planta o parte de ella con un ácido nucleico que codifica el Cf4 o con un homólogo funcional del mismo, la planta en mención no es de tomate o de tabaco. La planta en mención o parte de ella es de preferencia seleccionada a partir de un grupo de plantas tales como la planta de banano, trigo, remolacha azucarera, maíz y apio. El homólogo funcional es de preferencia una proteína Hcr9-Avr4.

En su realización, la transformación consiste en introducir un vehículo de ácidos nucleicos de entrega. De preferencia un vector de expresión. Un vector de expresión caracterizado por un vector viral. De preferencia un adenovirus o un retrovirus.

Además, el método utilizado para detectar la resistencia de una planta o parte de ella a, por lo menos, un patógeno consiste en: a) detectar por lo menos un

patógeno con la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum* o una región ortóloga de la proteína, b) seleccionar por lo menos un patógeno que contenga la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum* o una región ortóloga de la proteína, c) introducir por lo menos un patógeno dentro de la planta o parte de ella y, d) detectar en dicha planta o parte de ella la ausencia o presencia de una respuesta de defensa a por lo menos un patógeno, la planta en mención no es de tomate o de tabaco. La planta en mención o parte de ella es de preferencia seleccionada a partir de un grupo de plantas tales como la planta de banano, trigo, remolacha azucarera, maíz y apio. La región ortóloga mencionada debe de preferencia contener un componente vinculante: la quitina, muy similar a la que hace parte de la gran familia de las proteínas de quitina CBM14. Dicha región ortóloga debe igualmente contener, de preferencia, una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de un grupo compuesto de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, de preferencia seleccionados del grupo compuesto de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

El patógeno mencionado en los métodos de esta invención es un hongo, con la salvedad de que el patógeno no sea un *Cladosporium fulvum*. De preferencia un hongo Dothideomycete. Dicho Dothideomycete es prefrentemente seleccionado de un grupo compuesto de *Mycosphaerella fijiensis*, *Cercospora nicotianae*, *Cercospora beticola*, *Cercospora zeina*, y *Cercospora apii*.

Adelante se establecerá el método relacionado con la invención para incrementar la resistencia de una planta o parte de ella a por lo menos un patógeno, la planta en mención no es de tomate o de tabaco. Así mismo como los métodos relacionados con la invención para detectar la resistencia de una planta o parte de ella a por lo menos un patógeno, la planta en mención no es de tomate o de tabaco. La planta en mención o parte de ella es de preferencia seleccionada a partir de un grupo de plantas tales como la planta de banano, trigo, remolacha azucarera, maíz y apio. El patógeno mencionado es de preferencia un hongo, con la salvedad de que dicho hongo no sea un *Cladosporium fulvum*. De preferencia un hongo Dothideomycete. Dicho Dothideomycete es prefrentemente seleccionado a partir de un grupo compuesto de *Mycosphaerella fijiensis*, *Cercospora nicotianae*, *Cercospora beticola*, *Cercospora zeina*, y *Cercospora apii*.

Se afirma además que la presente invención no incluye cualquiera de los métodos o plantas se descritas en el WO 96/35790. Esto se relaciona

específicamente a un método para introducir Cf4 en plantas y proveerlas resistencia a *C.fulvum*. En otras palabras, desarrollar plantas transgénicas conteniendo la secuencia Cf4. También se excluyen de la presente invención las plantas transgénicas para ambas secuencias: Cf4 y Avr4. Además se excluyen las plantas transgénicas de tomate y de tabaco para la secuencia Cf4 o la secuencia Avr4.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: Conservación del dominio de fijación de la quitina entre proteínas CBM_14 en base los modelos ocultos de Márkov (HMM). Siempre se conservan los residuos de cisteína (abreviados como C)

Figura 2: El patrón de enlaces disulfuro de Avr4 de *C. fulvum* (Van den Burg *et al.* 2003). Barras unidas abiertas representan tres puentes disulfuro conservados del dominio de fijación de la quitina del invertebrado (inv ChBD). Las bandas conectadas representan patrones adicionales. Se espera un patrón de enlaces disulfuro similar para *M. fijiensis* así como para los ortólogos Avr4 de *Cercopsora*.

Figura 3: Alineación de las secuencias de aminoácidos de la proteína Avr4 de *C. fulvum* (SEQ ID NO: 1) y de ortólogos de la misma de *M. fijiensis* (SEQ ID NO: 2), *C. nicotianae* (SEQ ID NO: 3), *C. beticola* (SEQ ID NO: 4), *C. zeina* (SEQ ID NO: 5), y *C. apii* (SEQ ID NO: 6). Un supuesto dominio de fijación de la quitina (subrayado) está presente en las tres secuencias. Los residuos de cisteína conservados (en negrita) que forman parte de la formación de puentes disulfuro e importantes para la estabilidad de la proteína también están señalados.

Figura 4: Infiltraciones de Avr4 de *M. fijiensis* en plantas de tomate con Cf4 (izquierda) y Cf0 (derecha). Para el propósito de este experimento se utilizó el sistema de expresión *Pichia pastoris* para producir MfAvr4. En esta figura se muestra extractos crudos de MfAvr4 aislados de un filtrado de cultivo de *P. pastoris* que produce MfAvr4. Los extractos fueron infiltrados en plantas de tomate con Cf-4 (conteniendo la resistencia a la proteína Cf4 en su cognado afín) y plantas de tomaye Cf-0 (sin presencia de resistencia a proteína Cf4).

Infiltraciones con MfAvr4 demuestran claramente HR en presencia de genes de resistencia *Cf-4*. Imágenes tomadas 7 días después de la inyección.

Figura 5: Coexpresión transitoria de genes *Cf* de tomate y genes *Avr* de *C. fulvum* y *M. fijiensis* en *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltración. Cuatro cultivos de expresión transitoria de *Agrobacterium* fueron mezclados en proporción 1:1 e infiltrados. Las imágenes fueron tomadas seis días después de infiltración. Las imágenes demuestran que la coexpresión del *M. fijiensis Avr4* (*MfAvr4*) y del gen *Cf-4* del tomate inducen HR sobre las hojas de *N. benthamiana* (panel izquierdo). Sin embargo, no se inicia HR cuando *MfAvr4* es coexpresada con *Cf-9*, lo que demuestra la especificación de la interacción entre *Cf4* y *MfAvr4* (panel derecho). Para verificar este experimento, el *Avr4* de *C. fulvum* (*Avr4*) y el *Avr9* fueron coexpresados con *Cf-4* y *Cf-9*. En este caso, sólo se observa HR bajo coexpresión de *Avr4* y *Cf-4* (panel izquierdo) o *Avr9* con *Cf-9* (panel derecho), como se esperaba.

Figura 6: HR específica induce respuestas en una línea de tomate MM-*Cf4* después de expresión transitoria del *MfAvr4*, utilizando un sistema de expresión basado en PVX. Cotiledones de una línea de tomate de cuatro semanas portadora del gen de resistencia *Cf-4* (MM-*Cf4*) fue inoculada con *A. tumefaciens* transformantes de PVX::PR1a*MfAvr4*. Estos transformantes albergan el ADNc de *M. fijiensis Avr4* en el PVX binario basado en el vector pSfinx, secuencia abajo del promotor 35S y en fusión con la secuencia de señal del tabaco. Se inicia HR sólo en foliolios de la línea de tomate MM-*f4* pero no en los foliolios de la líneas MM-*Cf0*, lo que demuestra el reconocimiento específico del *MfAvr4* por *Cf4*. Para verificar, se utilizaron el PVX que contenía el vector pSfinx vacío (PVX::pSfinx) y el *Avr4* de *C. fulvum* en un vector binario (PVX::PR1a*Avr4*). Como esperado, la expresión basada en PVX de *Avr4* *C. fulvum* inicia HR sólo en la línea MM-*Cf4* pero no en la línea MM-*Cf0*. Sólo se observaron síntomas de mosaicos bajo inoculación de las líneas MM-*Cf4* y *Cf-O* que comprenden el vector vacío pSfinx. Las imágenes fueron tomadas 14 días después de la inoculación.

Figura 7: Fijación específica de *MfAvr4* sobre la quitina pero no hacia otros polisacáridos. Un cultivo filtrado de *Pichia pastoris* con *MfAvr4* fue incubado junto con quitina de cáscara de cangrejo insoluble, resina agarosa de quitina, celulosa y xylan a temperatura ambiente durante dos horas. La afinidad de la

fijación a la quitina fue determinada mediante geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) analizando la fracción de la proteína fijada (B) y la fricción de la proteína no fijada (S) en geles separados. La proteína His-Flag-tagged MfAvr4 fue detectada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-Flag-tag. Se cargó la misma cantidad de proteína fijada y no fijada sobre el gel. Para este objetivo, la fracción de proteína en el sobrenadante fue precipitada en presencia de Ácido Tri Cloro Acético (TCA) al 10% (peso/volumen) S, proteína que permanece en la fracción sobrenadante concentrada; P, proteína fijada a la fracción polisacárido insoluble. MfAvr4 se precipita especialmente con la quitina y un enlace específico fue confirmado en cinco experimentos independientes duplicados.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Como mencionado en el presente documento, el término "planta o parte de ella" se refiere a cualquier planta entera o parcial, incluso a las células individuales y tejidos celulares, como las células vegetales que se encuentran intactas en las plantas, grupo de células y cultivos de tejidos de las plantas que pueden ser regeneradas. Partes de planta se refiere, de forma no limitativa, a células individuales y tejidos de polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, ápices de las raíces, anteras, flores, frutas, tallos, brotes y semillas, así como polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, ápices de las raíces, anteras, flores, frutas, tallos, brotes, injertos, esquejes, semillas, callos y similares.

Como mencionado en el presente documento, el término "variedad" se refiere a como se lo define en el tratado de la UPOV y al grupo de plantas similares que por sus características estructurales o genéticas y/o rendimiento pueden distinguirse de otras variedades de la misma especie.

El término "cultivo o variedad" (para variedad cultivada) como mencionada en el documento se refiere a una variedad que no se encuentra normalmente en la

naturaleza, sino a una variedad que ha sido cultivada por seres humanos, es decir que tiene un estado biológico otro que un estado "silvestre"; el estado "silvestre" indica a su vez el origen no cultivado, el estado natural o adquisición. de la planta. El término "cultivo o variedad" incluye, pero no se limita a, cultivos
5 tradicionales, semi-naturales, semi-silvestres, maleza o mala hierba, variedades criollas o locales, material de reproducción, material de investigación, población sintética, híbridos, población fundadora basada en material almacenado, líneas puras (derivada de cultivos híbridos), población segregada, mutantes genéticos almacenados, y cultivos mejorados.

10

El término "clado" significa un grupo monofilético, definido como un grupo constituido de una población ancestral común y de sus descendientes.

El término "patógeno" se refiere a cualquier agente biológico que origina o
15 desarrolla una enfermedad a su hospedador. Esto incluye a bacterias, hongos, virus y priones.

El término "gen" se refiere a una unidad hereditaria (a menudo indicada por una secuencia de ADN) que ocupa un lugar específico en un cromosoma y que
20 contiene la información genética específica como las características o rasgos fenotípicos de un organismo, como una planta.

El término "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o
ribonucleótidos y polímeros de los mismos, ya sea en forma monocatenario o
25 bicatenario, compuesto de monómeros (nucleótidos) con azúcar, fosfato y una base que puede ser de purina o pirimidina. A menos específicamente limitado, el término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos naturales conocidos con propiedades de fijación similares al ácido nucleico y metabolizados de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que
30 se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico también abarca variantes conservadoras modificadas de la misma (por ejemplo, sustitución de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia expresamente indicada. En concreto, la sustitución de codones degenerados puede lograrse mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más
35 de los codones seleccionados (o todos) sean sustituidos con base mixta y/o residuos

de deoxinosina (Batzner *et al*, 1991;.. Ohtsuka *et al*, 1985; Rossolini *et al* 1994). Un "fragmento de ácido nucleico" es una fracción de una molécula de ácido nucleico determinado. En plantas superiores, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el material genético mientras que el ácido ribonucleico (ARN) está involucrado en la transferencia de la información contenida en el ADN de proteínas. El término "secuencia de nucleótidos" se refiere a un polímero de ADN o ARN que puede ser monocaterio o bicatenario, que contiene como opción bases sintéticas, nucleótidos no naturales o modificados capaces de incorporarse en los polímeros de ADN o ARN. Los términos "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" también puede usarse indistintamente con el gen, el ADNc, ADN y ARN codificado por un gen

El término "homología" se define como (tener) una o varias similitudes entre las características que se debe a su ascendencia común. En genética, se puede observar la homología en las secuencias de ADN que codifican las proteínas (genes) y en el ADN no codificante. De los genes codificantes de proteínas, uno de ellos puede comparar una secuencia de aminoácidos traducido de diferentes genes. De las proteínas, una de ellas puede comparar secuencias de aminoácidos de proteínas diferentes. La homología de secuencia también puede indicar una función común.

La palabra "homólogo", utilizado en la patente significa cualquier gen o proteína relacionada con un segundo gen o segunda proteína por ascendencia de una secuencia de ADN ancestral común. El término, homólogo, puede aplicarse a la relación entre los genes o las proteínas separadas por el evento de especiación (ortología) o a la relación entre los genes o las proteínas separadas por el evento de la duplicación genética (paralogía).

El término "homólogo de" en el contexto de la identidad de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos, se refiere a la similitud entre las secuencias de nucleótidos de dos moléculas de ácido nucleico o entre las secuencias de aminoácidos de dos moléculas de proteínas. Las estimaciones de la homología de esos servicios, ya sea de ADN-ADN o hibridación ADN-ARN en condiciones de rigor, como es bien entendido por los expertos en la materia (como se describe en Haines y Higgins (eds.), hibridación de ácidos nucleicos, IRL Press, Oxford , Reino Unido), o por la comparación de similitud de secuencias entre los dos ácidos

nucleicos o las proteínas. Dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos son homólogos cuando sus secuencias tienen una similitud de secuencias de más de 50%, preferiblemente más del 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, o incluso el 98%.

5 La palabra "ortólogo" se refiere a cualquier gen o proteína de una especie similar a uno o más genes o proteínas de otra especie. Esto incluye ortólogos surgidos de un ancestro común. Genes o proteínas que se encuentran dentro de un clado son ortólogos, descendientes de un ancestro común. A menudo, pero no siempre, los ortólogos tienen la misma función. También incluye homologías que
10 han surgido por evolución convergente.

Los términos "ingeniería genética", "tecnología de ADN recombinante", "modificación / manipulación genética (GM)" y "empalme génico" se emplean para referirse a las técnicas para la manipulación directa de genes de un organismo.
15 Estas técnicas son diferentes de las técnicas tradicionales de crianza, donde los genes del organismo son manipulados indirectamente. Se utilizan las técnicas de clonación molecular y transformación para alterar la estructura y características de los genes directamente. Las técnicas de ingeniería genética han encontrado algunos éxitos en numerosas aplicaciones, como en la mejora de la tecnología del cultivo, la fabricación de insulina humana sintética a través del uso de bacterias modificadas, la fabricación de la eritropoyetina en las células de ovario de hámster y la producción de nuevos tipos de ratones experimentales, como el "oncomouse" (ratón del cáncer) para la investigación. En general, la ingeniería genética, la tecnología del ADN recombinante, la modificación / manipulación
25 genética (GM) se constituyen de cinco pasos principales: 1) el aislamiento de los genes de interés, 2) la inserción de los genes en un vector de transferencia, 3) la transferencia del vector en el organismo para ser modificado, 4) la transformación de las células del organismo y 5) la selección de los organismos genéticamente modificados (OMG) y los que no se han modificado con éxito.

30

El término "transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en el genoma de una célula hospedadora, lo que resulta en una herencia genéticamente estable. Las células hospedadoras que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformado son llamadas células
35 "transgénicas" y los organismos que comprenden las células transgénicas se les

conoce como "organismos transgénicos". Algunos ejemplos de métodos de transformación de plantas y células vegetales son la transformación mediada por *Agrobacterium* (De Blaere *et al.*, 1987.) tecnología bombardeo de partículas (Klein *et al.* 1987;. Patente de EE.UU. No. 4.945.050), la microinyección, la precipitación CaPO₄, lipofección (fusión de liposoma), el uso de una pistola génica y el vector transportador de ADN (Kao *et al.*, 2008). Plantas enteras puede ser regeneradas a partir de células transgénicas con métodos bien conocidos por los expertos en la materia (ver, por ejemplo, Fromm *et al.*, 1990).

Los términos "transformado", "transgénico" y "recombinante" se refieren a un organismo hospedador, como una bacteria o una planta en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heterólogo. La molécula de ácido nucleico heterólogo puede ser integrada de forma estable en el genoma, conocido generalmente en la disciplina y como descrito en Sambrook *et al.*, 1989. Ver también Innis y Gelfand, 1999. Por ejemplo, las plantas o los callos "transformados", "transformantes" y "transgénicos" han pasado por el proceso de transformación y contienen un gen foráneo integrado en sus cromosomas. El término "sin transformar" se refiere a las plantas normales que no han pasado por el proceso de transformación.

En este documento, "vector" se refiere a cualquier molécula de ADN utilizada como vehículo para la transferencia de material genético foráneo en otra célula. Esto incluye plásmidos, bacteriófagos y otros virus, cósmidos y los cromosomas artificiales. El vector puede comprender un origen de replicación, un sitio de multiclonación, y / o un marcador de seleccionable.

El término "vector de expresión" se define como cualquier expresión de construcción que se utiliza para introducir un ácido nucleico específico en una célula diana y expresa la proteína que es codificada por el que el ácido nucleico. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula, la proteína que es codificada por el ácido nucleico puede ser producida por la transcripción celular y maquinaria de traducción. Esto incluye vectores de expresión que comprenden secuencias reguladoras que actúan como potenciadoras y promotoras de las regiones y da lugar a la transcripción eficiente de los ácidos nucleicos realizada en el vector de expresión. También incluye vectores de expresión que conforman un

19
codón de terminación, el ajuste de la distancia entre el promotor y el gen clonado, una secuencia de terminación de la transcripción y / o un PTIS (secuencia de portátil de iniciación de la traducción).

5 La palabra "plásmido" se refiere a cualquier molécula de ADN extra-cromosómico separado del ADN cromosómico capaz de replicarse independientemente del ADN cromosómico. Esto incluye, generalmente, cualquier secuencia de ADN bicatenario circular, capaz de reproducir de forma automática en una célula hospedadora.

10 Tal como mencionado, el término "virus" se refiere a cualquier agente infeccioso microscópico que sólo pueda reproducirse dentro de una célula hospedadora. Esto incluye todos los virus sin envoltura, es decir que comprende una capa de proteína que protege los genes de los virus. También incluye todos los
15 virus con envoltura, es decir que además comprende una envoltura de grasa que rodea el virus cuando está fuera de la célula hospedadora. Incluye todos los virus de ADN, los virus de ARN y virus de transcripción inversa.

El término "adenovirus" como se usa aquí se refiere a cualquier virus
20 icosaédral sin envoltura, que se compone de un nucleocápside y un genoma ADN bicatenario linear perteneciente a la familia de *Adenoviridae*.

El término "retrovirus" significa cualquier virus de ARN duplicado en una célula hospedadora a través de la enzima transcriptasa inversa para producir
25 ADN de su genoma de ARN y perteneciente a la familia de *Retroviridae*.

El término "virus basado en" se refiere a que se basa en cualquier virus de ingeniería genética portador de ADN o ARN viral modificado que se ha vuelto no infeccioso, pero aún así cuenta con promotores virales y el ácido nucleico a
30 traducir, lo que permite la traducción de los ácidos nucleicos a través de un promotor viral.

Un "gen marcador" codifica un rasgo seleccionable o de muestreo. El término "marcador seleccionable" se refiere a una secuencia de polinucleótidos
35 que codifica un rasgo metabólico que permite la separación de los organismos

transgénicos y no transgénicos. La mayoría se refiere a la provisión de resistencia a los antibióticos. Un marcador seleccionable es por ejemplo el marcador *aphL1* codificado para la resistencia a la kanamicina, el gen *nptII*, el gen que codifica la resistencia a la higromicina. Otros marcadores seleccionables son por ejemplo los genes indicadores, como el cloranfenicol acetil transferasa, β -galactosidasa, luciferasa y la proteína de fluorescencia verde. Los métodos de identificación para los productos de genes indicadores incluyen, de forma no limitativa, ensayos enzimáticos y ensayos fluorimétricos. Genes indicadores y ensayos para detectar sus productos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel *et al.*, Greene Publishing y Wiley-Interscience: Nueva York (1987) y actualizaciones periódicas.

Los términos "péptido" y "proteína" son utilizados indistintamente y se refieren a cualquier polímero formado a partir de los aminoácidos que están unidos en un orden definido por enlaces de amida o peptídicos. Esto incluye todos los péptidos ribosomas, los péptidos no-ribosomas, peptonas, monopectidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, polipéptidos y fragmentos peptídicos.

El término "secuencia de codificación" como se usa aquí se refiere a una secuencia de ADN o ARN que codifica para una secuencia de aminoácidos específicos y excluye las secuencias no codificantes. Puede constituir una "secuencia ininterrumpida de codificación", es decir, que carecen de un intrón, como en un ADNc o puede incluir uno o más intrones ligados por zonas de unión apropiadas. Un "intrón" es una secuencia de ARN que figura en la transcripción primaria, pero que se elimina a través de una división y se liga de nuevo al ARN dentro de la célula para crear el ARNm maduro que puede ser traducido en una proteína.

Las "secuencias reguladoras" se refieren a las secuencias de nucleótidos ubicadas secuencia arriba (5' secuencias no codificantes), dentro de, o secuencia abajo (3' secuencias no codificantes) de una secuencia de codificación, y que influyen en la transcripción, el procesamiento del ARN o la estabilidad, o la traducción de la secuencia de codificación asociada. Las secuencias reguladoras incluyen potenciadores, promotores, secuencias de traducción líder, intrones y secuencias de poliadenilación de la señal. Se incluyen secuencias naturales y

sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Como se señaló anteriormente, el término "secuencias reguladoras adecuadas" esto no se limita a los promotores.

El término "promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos, por lo general secuencia arriba (5 ') con su secuencia de codificación, que controla la expresión de la secuencia de codificación proporcionando el reconocimiento de la ARN polimerasa y otros factores necesarios para la transcripción adecuada. "Promotor", incluye un promotor mínimo que es una secuencia corta de ADN consta de una caja TATA y otras secuencias que sirven para indicar el sitio de iniciación de la transcripción, a la que se añaden elementos de regulación para el control de la expresión. "Promotor" también se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende un promotor mínimo, más los elementos de regulación que es capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o un ARN funcional. Este tipo de secuencia del promotor se compone de elementos secuencia arriba proximal y distal; a menudo se refiere a estos últimos como potenciadores. En consecuencia, un "potenciador" es una secuencia de ADN que pueden estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o de un elemento heterólogo insertado para mejorar el nivel o la especificidad de tejido de un promotor. Es capaz de operar en ambas orientaciones (normal o volteado), y es capaz de funcionar incluso cuando se mueve ya sea secuencia arriba o abajo de la promotora. Tanto los potenciadores y otros elementos promotores secuencia arriba se unen a proteínas de secuencia específica de unión al ADN que es mediada por sus efectos. Los promotores pueden ser derivados en su totalidad a partir de un gen nativo, o estar compuestos de distintos elementos derivados de diferentes promotores en la naturaleza, o incluso estar compuestos de segmentos de ADN sintético. Un promotor también puede contener secuencias de ADN que están involucrados en la unión de factores de proteínas que controlan la efectividad de la iniciación de la transcripción en respuesta a las condiciones fisiológicas o de desarrollo.

30

El término "promotor constitutivo" se refiere a un promotor capaz de expresar el marco de lectura abierta (ORF) que controla en todos o casi todos los tejidos de la planta durante todo o casi todas las etapas del desarrollo de la planta.

35

El término "expresión", se refiere a la transcripción y / o traducción de un gen endógeno, de lectura abierta (ORF) o parte del mismo, o de un transgén en las plantas. Expresión se refiere a la acumulación de transcripción y acumulación estable de efectores (ARNm) o ARN funcional. La expresión puede referirse también a la producción de proteínas.

El término "expresión constitutiva", se refiere a la expresión que utiliza un promotor constitutivo. "La expresión transitoria" es una expresión como resultado de un evento de transformación transitorio. La expresión transitoria de un gen se refiere a la expresión de un gen que no está integrado en el cromosoma hospedador, sino que funciona de forma independiente, ya sea como parte de un casete de replicación autónoma del plásmido o de expresión, por ejemplo, o como parte de otro sistema biológico, como un virus.

El término "cebador", se refiere a un oligonucleótido capaz de reconocer con el objetivo de amplificación que permite una polimerasa de ADN para fijar lo que servirá como un punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se coloca bajo condiciones en las que la síntesis del primer producto de extensión que se complementaria a una cadena de ácido nucleico es inducida, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente de polimerización de la ADN-polimerasa y a una temperatura adecuada y el pH. El cebador (de amplificación) es preferentemente monocatenario para una máxima eficiencia en la amplificación. Preferiblemente, la cartilla es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de la extensión en la presencia del agente de polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura y la fuente del cebador. Un "par de cebadores bi-direccionales" se refiere a un primario y un cebador inverso de uso común en esta disciplina de amplificación de ADN como en la amplificación de PCR.

El término "sonda" es una secuencia de oligonucleótidos bicatenario que reconocerá y formará un dúplex con enlaces de hidrógeno con una secuencia complementaria en una secuencia de ácido analita o de sus derivados ADNc.

Los términos "condiciones restrictivas" o "condiciones de hibridación astringentes" se refieren a las condiciones de hibridación que afectan la estabilidad de los híbridos, por ejemplo, temperatura, concentración de sal, pH, concentración de formamida y similares. Estas condiciones son empíricamente optimizadas para maximizar la unión específica y reducir al mínimo la unión no específica de la cartilla o la sonda a su secuencia de ácido nucleico. Los términos utilizados incluyen una referencia sobre las condiciones a las cuales una sonda o cebador se hibridan con la secuencia del destino, en un grado detectable mayor que otras secuencias (por ejemplo, por lo menos dos veces en segundo plano). Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia y serán diferentes según las circunstancias. Secuencias más largas hibridan específicamente a altas temperaturas. En general, las condiciones restrictivas son seleccionadas para ser de unos 5°C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definido. La T_m es la temperatura (bajo de la fuerza iónica y pH) en los cuales el 50% de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda perfectamente adaptados o imprimación.

Por lo general, las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que alrededor de 1,0 M Na⁺ ion, por lo general alrededor de 0,01 a 1,0 M Na⁺ + concentración de iones (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos 30°C para las sondas cortas o los cebadores (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y por lo menos unos 60°C para sondas largas o cebadores (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizadores como la formamida. Ejemplo de bajas condiciones restrictivas o de "condiciones restrictivas bajas" incluyen la hibridación con una solución tampón de 30% de formamida, 1 M NaCl, 1% SDS a 37°C y un lavado en 2x SSC a 40°C. Ejemplar condiciones muy rigurosas incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, 1% SDS a 37°C, y un lavado en 0,1 x SSC a 60 ° C. Procedimientos de hibridación son bien conocidos en la técnica y se describe en el ejemplo Ausubel, FM, Brent, R., Kingston, RE, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA, Struhl, K. eds. (1998) Los protocolos actuales en biología molecular. V.B. Chanda, series ed. Nueva York: John Wiley & Sons.

Descripción

A parte del Ecp6, hasta el momento nunca se han identificado homólogos de las proteínas efectoras de *C. fulvum* en otras especies fúngicas (Bolton et al. 2008). Sin embargo, los inventores han descubierto que varios otros hongos, pertenecientes a la clase de Dothideomycetes, agrupados en la familia de *Mycosphaerellaceae*, incluyendo *M. fijiensis*, *C. nicotianae*, *C. beticola*, *C. zeina*, y *C. apii* producen efectores que están funcionalmente relacionados con los de *C. fulvum*. Mediante (i) búsqueda de homología utilizando BLAST, (ii) extracción de genomas fúngicos secuenciados para secuencias de nucleótidos homólogos y motivos de proteínas y (iii) utilizando técnicas basadas en PCR y paseos cromosómicos, los inventores han identificado ahora por primera vez, ortólogos de los efectores Avr4 del *C. fulvum* en los patógenos fúngicos *M. fijiensis*, *C. nicotianae*, *C. beticola*, *C. zeina*, y *C. apii* y han deducido sus secuencias de aminoácidos, tal como muestra la Figura 3. Esto indica que los homólogos efectores de Avr y Ecp del *C. fulvum* se encuentran como ortólogos en patógenos de plantas relacionadas que, sin embargo, infectan y provocan enfermedades en especies de plantas hospedadoras sin ninguna relación, como el banano (monocot), la remolacha azucarera y el tabaco (dicot).

En particular, fueron identificados ortólogos con varios grados de identidad con la proteína Avr4 de *C. fulvum* en *M. fijiensis* (34% iden.), *C. nicotianae* (32% iden.), *C. beticola* (27% iden.), *C. apii* (27% iden.), y *C. zeina*, (32% iden.), pero se espera que estén presentes en todos los grupos principales de especies fúngicas pertenecientes al orden de Dothideomycetes.

Ocho residuos de cisteína están presentes en la proteína Avr4 de *C. fulvum*, que intervienen en la formación de puentes disulfuro que tiene lugar en las proteínas que enlazan la quitina de la superfamilia CBM14 (quitina de enlace con peritrofina A; ver Figuras 1 y 2). Avr4 protege la quitina de la pared celular fúngica contra la quitinasa de la planta, in vitro y durante una infección. Estos residuos de cisteína también se conservan en los ortólogos de Avr4 presentes en *M. fijiensis*, *C. nicotianae*, *C. beticola*, *C. zeina*, y *C. apii*, lo que sugiere que dichos ortólogos también son capaces de enlazar quitina. De hecho, los inventores demuestran que los ortólogos Avr4 de *M. fijiensis* producidos en la *Pichia pastoris* también enlazan quitina, lo que indica que se trata de un ortólogo genuino u homólogo funcional de la Avr4 de *C. fulvum* (Figura 7). La implicación práctica de este importante hallazgo se demuestra en el ejemplo con el que los inventores demuestran que la coexpresión del ortólogo de la proteína Avr4 de *M. fijiensis* y la

proteína Cf4 de tomate inducen HR en plantas de tabaco. Por lo tanto, la resistencia a los hongos de plantas diferentes al tomate pertenecientes al orden Dothideomycetes, distinto de *Cladosporium fulvum*, que produzcan ortólogos Avr4, se puede incrementar proporcionando proteína Cf4 a dichas plantas.

5

En consecuencia, los inventores proporcionan un método para incrementar la resistencia de una planta, o parte de ella, que sea susceptible a infección por un patógeno constituido de una región ortóloga de la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum*. Dicho método implica la transformación de la planta mencionada, o parte de ella, con una codificación de ácido nucleico para Cf4 o un homólogo funcional del mismo, siempre que la planta en mención no sea de tabaco o de tomate. Los expertos verán claramente que el método se puede aplicar a cualquier planta que no sea de tomate, susceptible a infección por un patógeno constituido de una región ortóloga de la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum*. Preferiblemente, la planta en mención, o parte de ella, se seleccionará de un grupo formado por plantas de banano, trigo, remolacha azucarera, maíz o apio. Por ejemplo, la resistencia de la planta de banano a *M. fijiensis* se puede incrementar transformando la planta de banano con una codificación de ácido nucleico para la proteína Cf4.

15

Las plantas se pueden transformar con una codificación del ácido nucleico para un homólogo funcional de Cf4, como por ejemplo, una proteína que contenga una secuencia de aminoácidos que muestre un alto nivel de similitud con la secuencia de aminoácidos de Cf4 (sin ser propiamente Cf4) y que sea capaz de reconocer la proteína Avr4 y sus ortólogos. Los expertos apreciarán que se puedan encontrar proteínas homólogas aplicando cualquier método de muestreo conocido en la industria.. Por ejemplo, se pueden efectuar búsquedas de homología estructural en bases de datos, ya sea de proteínas o ADN. Además, se pueden extraer genomas de plantas secuenciados para secuencias de nucleótidos homólogos o motivos de proteínas. Al aplicar los métodos de extracción, se pueden aplicar técnicas de amplificación basadas en técnicas PCR para amplificar las secuencias de ADN.

20

25

30

Las proteínas homólogas se pueden encontrar en diferentes plantas. Por ejemplo, los inventores descubrieron que los homólogos funcionales de Cf4 etiquetados Hcr9-Avr4s están presentes en especies que pertenecen al

35

Lycopersicon lexicón del género *Solanum*: *S. hirsutum* (número de acceso al banco de genes AJ002235), *S. chilense* (AY634610), *S. chmielewskii* (AY634611), *S. parviflorum* (AY634612) y *S. peruvianum* (AY634613). Estas proteínas son entre un 93% y un 98% idénticas entre si, tal como se observa en la Tabla 1. Por lo
5 tanto, el homólogo funcional en mención es preferiblemente un péptido Hcr9-Avr4.

Tabla 1: Resultados de alineación de aminocácidos de los homólogos de Hcr9-Avr4 de *S. hirsutum*, *S. peruvianum*, *S. chmielewskii*, *S. chilense* y *S. parviflorum*.

	SeqA	Nombre	Len(aa)	SeqB	Nombre	Len(aa)	Resultado
5	1	<i>S_parviflorum</i>	807	2	<i>S_hirsutum</i>	806	93
	1	<i>S_parviflorum</i>	807	3	<i>S_peruvianum</i>	807	98
	1	<i>S_parviflorum</i>	807	4	<i>S_chmielewskii</i>	807	98
	1	<i>S_parviflorum</i>	807	5	<i>S_chilense</i>	807	95
10	2	<i>S_hirsutum</i>	806	3	<i>S_peruvianum</i>	807	93
	2	<i>S_hirsutum</i>	806	4	<i>S_chmielewskii</i>	807	93
	2	<i>S_hirsutum</i>	806	5	<i>S_chilense</i>	807	97
	3	<i>S_peruvianum</i>	807	4	<i>S_chmielewskii</i>	807	98
15	3	<i>S_peruvianum</i>	807	5	<i>S_chilense</i>	807	94
	4	<i>S_chmielewskii</i>	807	5	<i>S_chilense</i>	807	94
	=====						

Los métodos para transformar un organismo con ácido nucleico son conocidos en la industria, tal y como se describe, por ejemplo, en "Gene Transfer: Delivery And Expression of DNA And RNA, A Laboratory Manual", Friedmann and Rossi ed., 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, USA. Por ejemplo, es bien conocido que un organismo se puede transformar con ácido nucleico mediante la introducción de un vector que contenga el ácido nucleico.

Se puede utilizar prácticamente cualquier vehículo de administración de ácido nucleico para la entrega a las células de la planta receptora. Por ejemplo, se pueden emplear segmentos de ADN bajo la forma de plásmidos, vectores binarios *Agrobacterium* y vectores víricos, como vectores de expresión basados en virus o fragmentos lineales de ADN, que en algunos casos contienen sólo el elemento del ADN que debe expresarse en la planta, y similares. Cuando se empleen vectores basados en virus, tales vectores deben estar preferentemente basados en adenovirus o retrovirus. Los expertos en la materia conocerán la construcción de vectores que puede emplearse conjuntamente con la presente invención a la luz de la presente divulgación (ver, e. g., Sambrook et al., 1989; Gelvin et al., 1990). Con arreglo a la presente invención, los vectores, de forma inclusiva pero limitativa, plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levadura (YAC), cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y los segmentos de ADN para uso en células transformantes, comprenderán, por supuesto, el ADNc, gen o genes necesarios para la producción de la proteína deseada en el transformante.

El vector de la invención se puede introducir en cualquier planta. Los genes y secuencias a introducir se pueden utilizar a conveniencia en casetes de expresión para la introducción y expresión en cualquier planta de interés. El casete de transcripción incluirá en las direcciones de transcripción 5' a 3', las

regiones de iniciación de la transcripción y de la traducción, la secuencia de ADN de interés y, las regiones de terminación de la transcripción y de la traducción funcional en las plantas.

La región de terminación podrá ser nativa con la región de iniciación transcripcional, podrá ser nativa con la secuencia de ADN de interés o podrá derivar de otra fuente.

Las regiones de terminación adecuadas están disponibles desde el plásmido Ti (tumor inductor) de *A. tumefaciens*, como por ejemplo, las regiones de terminación de la octopina sintasa y la nopalina sintasa. Ver también Guerineau *et al.* (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141-144; Proudfoot (1991) Cell 64: 671- 674; Sanfacon *et al.* (1991) Genes Dev. 5: 141-149; Mogen *et al.* (1990) Plant Cell 2: 1261-1272; Munroe *et al.* (1990) Gene 91: 151-158; Ballas *et al.* (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7891-7903; Joshi *et al.* (1987) Nucleic Acid Res. 15: 9627-9639.

Las metodologías para la construcción de la transformación de la planta se describen en la industria.

La obtención de suficientes niveles de expresión transgénica en la planta transformada es un aspecto importante en la producción de cultivos modificados genéticamente. La expresión de secuencias de ADN heterólogo en una planta hospedadora depende de la presencia de un promotor operable ligado que sea funcional dentro de la planta hospedadora.

La transformación de las plantas se puede llevar a cabo con una molécula de ADN suelta o múltiples moléculas de ADN (como por ejemplo, la cotransformación). Ambas técnicas son adecuadas para el uso con los casetes de expresión de la presente invención. Se dispone de una gran cantidad de vectores de transformación para la transformación de plantas. Los casetes de expresión de la presente invención se pueden utilizar conjuntamente con cualquiera de esos vectores. La selección del vector dependerá de la técnica de transformación seleccionada y la especie diana para la transformación.

Los métodos adecuados para la transformación de células de plantas incluyen, de forma no limitativa, la microinyección (Crossway *et al.*, 1986), electroporación (Riggs *et al.*, 1986), transformación mediada por *Agrobacterium* (Hinchey *et al.*, 1988), transferencia genética directa (Paszkowski *et al.*, 1984), y aceleración de partícula balística utilizando los dispositivos disponibles en Agracetus, Inc., Madison, Wis. Y BioRad, Hercules, Calif. (ver, por ejemplo, Sanford *et al.*, Patente Americana N° 4,945,050; y McCabe *et al.*, 1988). Ver

también Weissinger *et al.*, 1988; Sanford *et al.*, 1987 (onion); Christou *et al.*, 1988 (soya); McCabe *et al.*, 1988 (soya); Datta *et al.*, 1990 (rice); Klein *et al.*, 1989 (maíz); Fromm *et al.*, 1990 (maíz); and Gordon- Kamm *et al.*, 1990 (maíz); Svab *et al.*, 1990 (cloroplasto de tabaco); Koziel *et al.*, 1993 (maíz); Shimamoto *et al.*, 1989 (arroz); Christou *et al.*, 1991 (arroz); European Patent Application EP 0 332 581 (orchard grass y otras *Pooideae*); Vasil *et al.*, 1992 (trigo); Weeks *et al.*, 1993 (trigo). Por ejemplo, la resistencia de la planta de banano a *M. fijiensis* incrementa transformando la planta de banano con un vector de expresión que contenga una codificación de ácido nucleico para la proteína Hcr9-Avr4.

10

Los expertos en la materia disponen de otros métodos de transformación, como por ejemplo, mediante la captación directa de las construcciones de ADN foráneo (ver EP 0295959), técnicas de electroporación (Fromm *et al.*, 1986) o bombardeo balístico de alta velocidad con partículas metálicas recubiertas con las construcciones de ácido nucleico (Klein *et al.*, 1987, y Patente Americana N° 4,945,050). Una vez transformadas, los expertos en la materia podrán regenerar las células.

15

Los expertos en la materia apreciarán que la elección del método podría depender del tipo de planta, es decir, si se trata de una planta monocotiledónea como el banano o dicotiledónea como la remolacha azucarera o las plantas de tabaco.

20

Para proporcionar una rápida y fácil prueba sobre si una especie de planta nueva puede dar realmente una respuesta de hipersensibilidad con la presentación de las proteínas efectoras de la invención, los expertos en la industria pueden hacer una de estas dos pruebas. La más fiable es la infiltración en las hojas de la proteína del elicitor y registrar la HR. Otra consiste en una prueba de expresión transitoria rápida conocida por el nombre de ATTA (análisis de expresión transitoria *Agrobacterium tumefaciens*). En este análisis (cuya descripción completa puede encontrarse en Van den Ackerveken, G., *et al.*, Cell 87, 1307-1316, 1996) la codificación de la secuencia para una proteína efectora se pone bajo control del promotor CaMV 35S y se introduce en una cepa de *Agrobacterium*, que también es utilizada para protocolos de transformación estable. Tras la incubación de la bacteria con acetosiringona, o cualquier otro compuesto fenólico conocido para mejorar el ADN-T de transferencia *Agrobacterium*, se infiltra 1 ml del cultivo de *Agrobacterium* en una planta

25

30

35

mediante una inyección, tras la cual las plantas se colocan en el invernadero. Entre 2 y 5 días después las hojas se pueden examinar para registrar la incidencia de HR.

5 También se proporciona un método para detectar la resistencia de una planta, o parte de ella, a al menos un patógeno. El método en mención consiste en: a) detectar por lo menos un patógeno con la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum* o una región ortóloga de la proteína, b) seleccionar por lo menos un patógeno que contenga la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum* en mención o
10 uno de sus ortólogos, c) introducir de lo mencionado por lo menos un patógeno dentro de la planta o parte de ella y, d) detectar en dicha planta o parte de ella la ausencia o presencia de una respuesta de defensa a por lo menos uno de los patógenos en mención, siempre que la planta en mención no sea de tomate. Preferiblemente, la planta en mención, o parte de ella, se seleccionará de un
15 grupo formado por plantas de banano, trigo, maíz, apio o remolacha azucarera. Preferiblemente, el ortólogo en mención estará constituido de un dominio de fijación de la quitina similar al que se encuentra en los miembros de la superfamilia CBM14 de proteínas de fijación de la quitina. Más preferiblemente, el ortólogo en mención estará constituido de una secuencia de aminoácidos
20 seleccionada de un grupo con los siguientes identificadores de secuencia: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6., más preferiblemente seleccionado de un grupo formado con los siguientes identificadores de secuencia: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. También es preferible el muestreo de una planta de tabaco con un
25 ortólogo de Avr4.

Los métodos para la detección de patógenos para péptidos son conocidos en la industria. Se puede detectar un patógeno para la presencia de Avr 4, o uno de sus ortólogos, mediante la aplicación del método o técnica que el experto en la materia considere adecuado. Tales métodos incluyen, de forma no limitativa,
30 electrofóresis de proteína como SDS-PAGE, electrotransferencia, inmunotransferencia o transferencia Western, inmunotinción de proteínas, inmunoprecipitación de proteínas, análisis de proteínas, espectrómetro de masas como MALDI-TOF y ESI-TOF, y cromatografía como HPLC y RPC. Por ejemplo, el método de transferencia Western detecta varios patógenos para la presencia de
35 Avr4, o uno de sus ortólogos. Basado en el resultado de la transferencia Western,

un patógeno constituido en Avr4 se selecciona y se introduce en una planta de
banano. También se pueden aplicar métodos de detección basados en la
bioinformática. Las búsquedas de similitud matemática, como por ejemplo
BLAST, también son muy adecuadas para la detección de péptidos en patógenos
con similitud a Avr4.

Un método para introducir el patógeno constituido en una proteína de
Avr4, o uno de sus ortólogos, en una planta que no sea de tomate, es mediante la
aplicación directa del patógeno en una parte de la planta, como por ejemplo, en
una hoja o segmento del tallo. Alternativamente, el patógeno se puede inyectar.
En una planta que no tenga el gen de resistencia cognado funcional la aplicación
del patógeno causará una enfermedad. Sin embargo, en un planta que esconda un
gen de resistencia funcional, la proteína Cf4, o uno de sus ortólogos, reconocerá al
Avr4, o a una de sus proteínas efectoras del ortólogo, que está expresado por el
patógeno y se iniciará una cascada que conducirá a una reacción de
hipersensibilidad. Como se ha discutido anteriormente, tal como muestra la
Figura 4, esto conducirá a una necrosis local en el tejido de la planta o, en una
reacción menos fuerte, a una clorosis en el lugar inyectado.

En lugar de aplicar directamente el patógeno en un planta, o parte de ella,
también es posible introducir el patógeno indirectamente en la planta, mediante
la transformación de la planta con una codificación de ácido nucleico para la
proteína Avr4, o uno de sus ortólogos. Una de las formas más adecuadas para
facilitar la expresión de la proteína en una planta, o parte de ella, es mediante el
método conocido como ATTA (análisis de expresión transitoria *Agrobacterium*
tumefaciens), en el que se proporciona la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* con
una construcción que codifica una proteína efectora con arreglo a la invención.
Puesto que en esta descripción se revelan las secuencias nucleótidas que
codifican las proteínas efectoras o se pueden derivar de las secuencias de
aminoácidos que también se proporcionan en la presente descripción, cualquier
experto en la materia será capaz de clonar una secuencia de codificación en un
vector de expresión, que sea adecuado para la transformación de *Agrobacterium*.

Alternativamente, se puede utilizar un vector vírico. Un ácido nucleico que
codifique la proteína efectora de Avr4, o uno de sus ortólogos, se puede clonar en
un vector vírico, después de lo cual las partículas víricas se utilizarán para
infectar a la planta, o parte de ella, y expresar la proteína. Utilizar un vector
vírico en el que el virus aún mantenga sus propiedades infecciosas tiene mayor

ventaja. Junto a la observación de necrosis local o clorosis, que indican la presencia del gen de resistencia, la ausencia del gen de resistencia también será visible, porque en tales plantas se desarrollará la enfermedad que provoca el virus. Por lo tanto, incluso si no se detectaran signos claros de respuesta de hipersensibilidad, una falta de enfermedad indicará la presencia de un mecanismo de resistencia. Por supuesto, un sistema así sólo será factible con plantas que sean normalmente susceptibles al virus que se haya utilizado como vector vírico.

Idealmente, habría que asegurarse que la proteína efectora de Avr4, o uno de sus ortólogos, sea secretada al espacio apoplástico, porque esta es la ubicación natural de la proteína efectora. Cuando el método de muestreo esté basado en inyectar la proteína en la planta, la proteína estará presente en el espacio apoplástico de manera automática. Si el método de muestreo se aplica donde Avr4, o uno de sus ortólogos, ha sido introducido en una planta mediante un vehículo de administración de ácido nucleico que codifica Avr4, o uno de sus ortólogos, la expresión en el espacio apoplástico se alcanzará proporcionando a la secuencia nucleótida una secuencia de señal para la diana extracelular. Tales secuencias de señal están disponibles para los expertos de la industria y un ejemplo es la secuencia de señal del gen PR-1 de tabaco. Se pueden encontrar secuencias alternativas en el péptido Avr4, el gen de extensión de la zanahoria o en los estudios de secuencias de señal del extremo N-terminal (Small, I. et al., 2004, Proteomics 4:1581-1590).

Se ha previsto que tanto el método para incrementar la resistencia de la planta, como el método para detectar la resistencia de la planta según se ha descrito anteriormente, se utilizará cuando se críen o construyan plantas con una resistencia fúngica basada en la presencia de mecanismos de resistencia frente a Avr4/ortólogo-Cf4/homólogo. Por lo tanto, lo proporcionado es el uso de un método para incrementar la resistencia de una planta, o parte de ella, a al menos un patógeno, siempre que la planta en mención no sea una planta de tomate o de tabaco. Además, también se proporciona el uso de un método para incrementar la resistencia de una planta, o parte de ella, a al menos un patógeno, siempre que el patógeno en mención no sea *C. fulvum*, y la planta en mención no sea de tomate.

En el caso de programas de crianza para la introducción de Avr4/ortólogo-Cf4/homólogo basados en la resistencia, el criador normalmente partirá de una

planta que contenga Cf4 o uno de sus homólogos funcionales. Esta línea de plantas se utilizará como línea paterna y se cruzará con otra planta para crear descendencia. Se podrán realizar pruebas en la descendencia sobre la presencia de mecanismo de resistencia, mediante la aplicación del método de muestreo descrito anteriormente. Entonces, este proceso se repetirá hasta obtener el producto deseado. En lugar de descendencia, también será posible la creación de resistencia utilizando técnicas recombinantes. En tal caso, el gen que codifique el gen de resistencia será clonado en un vector apropiado y la planta diana será transformada con este vector. La expresión funcional de la resistencia del gen se podrá, entonces, evaluar mediante la aplicación del método de detección en el que se proporciona a la planta la proteína efectora Avr4, o uno de sus ortólogos.

Junto a la utilización de las características de resistencia existentes de las especies *Solanum* o *Nicotiana* en programas de crianza de resistencia molecular para conseguir un amplio espectro, en especies albergadoras monocot y dicot atacadas por hongos patógenos de hongos Dothideomycete salvo *C. fulvum*, que produce homólogos funcionales del efector Avr4 *C. fulvum*, quedará claro que la invención también se puede ampliar a la identificación de nuevas características de resistencia en la planta de banano, remolacha azucarera, tabaco, maíz y apio, mediante vectores de expresión basados en virus, que expresen homólogos de Avr4 para los hongos mencionados anteriormente.

Se han aislado varios promotores que pueden dirigir una sólida expresión casi constitutiva en plantas monocot y/o dicot, incluyendo el promotor de ubiquitina del maíz (Christensen *et al.* 1996), promotor del gen actina 1 del arroz (McElroy *et al.* 1990), varios promotores 35S mejorados del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Mitsuhara *et al.* 1996, Kay *et al.* 1987, Vai *et al.* 1996), badnavirus baciloforme de la caña de azúcar (ScBV) (Schenk *et al.* 1999), promotor pEmu sintético (Last *et al.* 1991), virus del cogollo racemoso del banano (BBTV) (Hermann *et al.* 2001), virus del mosaico de la vena en yuca (CVMV) (Verdaguer *et al.* 1996), y otros (Sch•nnmann *et al.* 2003) que también se pueden utilizar en estos métodos.

La invención queda ejemplificada con el siguiente ejemplo. El ejemplo pretende ilustrar la invención, sin limitar su ámbito de aplicación en modo alguno.

EJEMPLO

Materiales y Métodos

Las manipulaciones de ADN se llevaron a cabo mediante los protocolos estándar (Sambrook *et al.* 1989). Los PCR se ejecutaron con SuperTaq (HT Biotechnology Ltd) o Pfu (Stratagene), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las enzimas de restricción, ligasa T4 y las células de *Escherichia coli* DH5• eran de Life Technologies (Breda, Países Bajos). Los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Aldrich. Las plantas de tomate y *Nicotiana benthamiana* crecieron bajo las condiciones estándar de invernadero. Para las inoculaciones PVX se usaron líneas de tomate MM-CF (sin genes de resistencia Cf conocidos) y MM-Cf4 (portadoras del gen de resistencia Cf-4) con cuatro semanas de edad, mientras que para las agroinfiltraciones se utilizaron plantas de *N. benthamiana* de entre seis y ocho semanas de edad. La autenticidad de todas las construcciones generadas fue confirmada por secuenciación en MacroGen Inc.

Producción heteróloga de la His₆-FLAG-tagged MfAvr4 en *Pichia pastoris*

Los plásmidos para la expresión de la región N-terminal de la proteína His₆-FLAG-tagged MfAvr4 en la levadura metilotrófica *P. pastoris* se generaron como se ha descrito anteriormente (Rooney *et al.* 2005). En resumen, el vector pPIC-9 (Invitrogen) fue modificado mediante la inserción de un casete que contenía un fragmento de ADN que codificaba la etiqueta His₆, mientras que los sitios de restricción *SmaI*, *ApaI*, y *SacII* fueron introducidos para propósitos de clonación, dando como resultado el vector pPIC-9His. Para crear la proteína His₆-FLAG-tagged MfAvr4, el ORF de *MfAvr4* que codifica la proteína madura de MfAvr4 sin la secuencia péptida de señal, y después la eliminación intrón, fue amplificado desde el ADNc del hongo, utilizando polimerasa Pfu (Stratagene) y cebadores de Avr4F_pichia_FLAGtagged (gactacaaggacgacgatgacaagGCAACGATGCAG GTGCGAAC; el cebador es fosforilado en su extremo 5') y sitio Avr4R_pchia+EcoRI (TCAGAATTCTTACAGTTGTCGCATCC). En consecuencia, el producto amplificado fue clonado en pPIC-9His con los sitios de restricción *SmaI* y *EcoRI*. A continuación, se introdujo el plásmido en la cepa GS115 de *P. pastoris* (Invitrogen) mediante electroporación y se crecieron transformantes en placas YPD. Todos los medios utilizados para el crecimiento de *P. pastoris*, es decir, MD, YPD, y BMMY, fueron hechos siguiendo las instrucciones del

fabricante (Invitrogen). Para verificar que el *MfAvr4* fue clonado con éxito en el locus de AOX1 y que no hubo errores en el PCR introducido en la secuencia codificante, se realizó una secuenciación automática de ADN (Macrogen Inc.) en los plásmidos nuevamente aislados de cultivos de los transformantes de *P. pastoris*, que se obtuvieron utilizando los sitios del cebador AOXR (GCAAATGGCATTCTGACATCC) y AOXF (GACTGGTTCCAATTGACAAGC) presentes en pPIC-9.

Se llevó a cabo una fermentación de alta densidad celular de los transformantes de *P. pastoris* para la producción en escala de *MfAvr4*, de acuerdo con el procedimiento descrito por Stratton *et al.* (1998). En resumen, se crearon cultivos iniciadores de 50 mL durante dos días a 30°C (OD600 > 10) y se utilizaron para inocular un vaso de 2 L que contenía 900 mL FM22 medio. Los cultivos iniciadores se crearon a partir de una colonia fresca creada en una placa de siembra MD o YPD. Después del autoclave, el pH se ajustó a 4,9 con 5,0 M KOH ó 25% (peso/volumen) NH₄OH. La agitación se mantuvo a 1200 rpm y el caudal de aire se mantuvo a 1–2 vvm para mantener los niveles de oxígeno disuelto (DO) al menos por encima del 30%. De ser necesario, se previno la formación excesiva de espuma añadiendo unas gotas de desespumante 289 (Sigma). Aproximadamente 20 horas después de la inoculación, se observó una disminución del glicerol debido a un súbito incremento del DO. En esta fase, el suministro de glicerol se inició a razón de 10 mL L⁻¹ h⁻¹ (fase discontinua de suministro de glicerol), y se ajusto adecuadamente para mantener una lectura estable de DO (cerca del 35%). Tras 4 horas, el suministro de metanol se inició a razón de 3,4mL L⁻¹ h⁻¹. La tasa de suministro de metanol fue sabiamente incrementada por fases hasta 6 mL L⁻¹ h⁻¹, tan pronto como el cultivo se adaptó por completo a crecer en metanol (4–6 h). Para prevenir la acumulación de metanol se realizó un espiga de DO (se debe producir un incremento súbito de las niveles de DO tras interrumpir el suministro de metanol; Stratton *et al.*, 1998).

Análisis de fijación de la quitina

Examinamos si el *MfAvr4* tiene una afinidad específica con la quitina y los polisacaridos indisolubles diferentes a la quitina, utilizando un análisis de precipitación (Van den Burg *et al.* 2006). En paralelo, incluimos *Avr4* de *C. fulvum* en estos experimentos a modo de control positivo (datos no enseñados). Se obtuvo la proteína His₆-FLAG-tagged *MfAvr4* a partir de filtrado crudo de cultivo

de transformantes de *P. pastoris* tras la fermentación, y se examinó la fijación según se ha descrito anteriormente (Van den Burg *et al.* 2006). En resumen, se incubó MfAvr4 (100 µL de filtrado de cultivo de *P. pastoris*) con ~10 mg/mL de polisacáridos insolubles (quitina de cáscara de cangrejo, resina agarosa de quitina, quitosana, celulosa y xylan; todos Sigma, excepto la resina: Biolabs Nueva Inglaterra) en tampón de enlace de 1.8 mL consistente en 50 mM Tris.HCl pH8, 150 mM NaCl, y 1 inhibidor de proteasa. Las fracciones de polisacáridos habían sido preequilibradas en el tampón de enlace. Tras dos horas de mecido suave (15 rpm) a temperatura ambiente, la fracción insoluble fue granulada por centrifugación (3 min, 13,000×g) y se recogió el sobrenadante. La fracción de proteína del sobrenadante recuperado fue precipitada añadiendo el 10% (peso/volumen) de Ácido Tri Cloro Acético (TCA) a la concentración final e incubándola en hielo durante una hora. Después de la centrifugación (16,000×g durante 30 min), se lavó la proteína en gránulos en 80% (v/v) de acetona a -20°C y se redisolvió en un tampón de muestreo SDS-PAGE (1% de sulfato dodecil de sodio, 100 mM DTT, 100mM Tris.HCl pH6.8) por ebullición. Los polisacáridos insolubles se lavaron tres veces en el tampón de enlace. La fracción de proteína ligada fue eluída de los polisacáridos insolubles mediante ebullición durante diez minutos en el tampón de muestreo SDS-PAGE. Se cargaron y separaron cantidades iguales de la fracción de proteínas del sobrenadante en 20% SDS-PAGE estándar y se detectó MfAvr4 mediante inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-Flag monoclonal (M2, Sigma).

Análisis de agroinfiltración.

La coexpresión transitoria de *MfAvr4* con *Cf-4* u otros genes de interés se realizó mediante la infiltración de cultivos de *Agrobacterium* en los tejidos de hoja de la planta modelo *N. benthamiana* de la siguiente manera: para la expresión en la planta del ADNc de *MfAvr4* se sustituyó la secuencia que codifica el péptido de señal para la diana extracelular de MfAvr4 codificado, por la secuencia de una proteína PR-1a extracelular de tabaco (Hammond-Kosack *et al.* 1994; Hammond-Kosack *et al.* 1995; Honée *et al.* 1998; Joosten *et al.* 1997). En primer lugar, se amplificó PR-1a utilizando polimerasa *Pfu* (Stratagene) con cebadores PR1a-F (GGCCATGGGATTTGTTCTCTTTTCAC) y PR1a-R (ATTTTGGGCACGGCAAGAG). El ORF de *MfAvr4* que codifica la proteína MfAvr4 madura sin su secuencia de péptido de señal original, y después de la

eliminación intrón (*MfAvr4mature*), fue amplificado desde el ADNc del hongo utilizando polimerasa *Pfu* (Stratagene). Los cebadores usados para la amplificación de *MfAvr4mature* fueron PR1a_MfAvr4-F (CTTGCCGTGCCCCAAAATGCTGGAACGATGCAGGTGCG), introduciéndose en el extremo 5' del producto amplificado de 17bps que eran complementarios con el extremo 3' de la secuencia PR-1a (en *Cursiva* y subrayado) y MfAvr4-R (GGCTCGAGTTACACGTTGTCGCATCCTG), introduciéndose en el extremo 3' del producto amplificado en el sitio *XhoI* (en *Cursiva* y subrayado). El producto de fusión maduro PR-1a:MfAvr4 se generó mediante una PCR (Reacción de Polimerasa en Cadena) de extensión solapada utilizando polimerasa SuperTaq (HT Biotechnology Ltd) y fue posteriormente clonado en un vector pGEM®-T Easy Vector (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (construct pHB1). La autenticidad del producto de fusión se examinó mediante secuenciación personalizada de ADN (Macrogen Inc.), utilizando los sitios de enlace del cebador de secuenciación directo e inverso estándar pUC/M13 presentes en el vector pGEM®-T Easy Vector. A continuación, el producto maduro fusionado PR-1a:MfAvr4 fue escindido del pHB1 con un patrón de digestión *NcoI* and *XhoI* e insertado entre el promotor 35S y el terminador PI-II en un vector pRH80 digerido de igual modo (An *et al.* 1989, Van der Hoorn *et al.* 2000) (construcción pHB2). Finalmente, el casete 35S::PR-1a:MfAvr4mature::PI-II fue extirpado de pHB2 y posteriormente transferido al plásmido binario pMOG800 (Honée *et al.* 1998, Van der Hoorn *et al.* 2000), con el uso de los sitios de restricción *XbaI* y *EcoRI* (construcción pMfAvr4). Esta construcción final pMfAvr4 se transformó en una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV301 mediante electroporación, utilizando los procedimientos estándar (Hood *et al.* 1993). La agroinfiltración de las plantas *N. benthamiana* se llevó a cabo según lo descrito anteriormente (Van der Hoorn *et al.* 2000). Las construcciones de los genes de resistencia del tomate *Cf-4* (pCf4) y *Cf-9* (pCf9) y los efectores de *C. fulvum* *Avr4* (pAvr4) y *Avr9* (pAvr9) en el vector de expresión binario pMOG800, se construyeron según lo descrito para pMfAvr4 y ya estaban disponibles en el laboratorio (Van der Hoorn *et al.* 2000).

Expresión de MfAvr4 en la planta mediada con PVX

pSfinx (Takken *et al.* 2000) utilizó un vector binario que facilita la expresión del patógeno de ADNc bajo control del promotor de la cubierta proteínica del virus X

(PVX), como esqueleto para todas las construcciones de expresión PVX utilizadas en el presente estudio. Desde el extremo izquierdo hasta el derecho, el ADN-T de este vector consiste en una secuencia PVX dirigida por el promotor 35S de CaMV que contiene el gen replicasa, el bloque de tres genes, el promotor de la cubierta

5 proteínica duplicado y los genes de la cubierta proteínica. El sitio de clonación múltiple de pSfinx para la inserción dirigida del patógeno del ADNc (como genes *Avr*) está ubicado directamente secuencia abajo del promotor de la cubierta proteínica duplicada. pSfinx facilita la transferencia de la construcción de expresión a las células de la planta por *A. tumefaciens*, mientras que la posterior

10 replicación del virus da como resultado la expresión del patógeno del ADNc, que puede provocar una respuesta de hipersensibilidad, si el ADNc codifica una proteína de avirulencia que sea reconocida por un gen cognado R de la planta.

El plásmido pMfAvr4 descrito anteriormente, se utilizó para amplificar el producto de fusión PR-1a:MfAvr4mature con cebadores MfAvr4-F

15 (GGCCCGGGGCTGGACGATGCAGGTGCG) y MfAvr4-R (GGCTCGAGTTACACGTTGTCGCATCCTG) que introducen un sitio *Xma*I en el extremo 5' y un sitio *Xho*I en el extremo 3' del producto amplificado PR-1a:MfAvr4mature, respectivamente. Se llevaron a cabo PCR utilizando polimerasa SuperTaq (HT Biotechnology Ltd) y el producto fue posteriormente

20 clonado en un vector pGEM®-T Easy Vector (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (construct pHB4). A continuación el casete PR-1a:MfAvr4mature fue escindido de pHB4 con *Xma*I y *Xho*I y ligados en un vector pSfinx digerido del mismo modo, lo que dio como resultado la construcción final PVX::PR1aMfAvr4. La autenticidad de la construcción final fue examinada

25 mediante secuenciación de ADN solicitada a MacroGen Inc., utilizando cebadores (primers o indicadores) OX10 (5'-CAATCACAGTGTGGCTTGC-3') y N31 (5'-GACCCTATGGGCTGTGTTG-3') que flanquean el inserto de ADNc en la estructura de PVX. A continuación, la construcción final PVX::PR1aMfAvr4 se transformó en una cepa de *A. tumefaciens* GV301 mediante electroporación,

30 utilizando los procedimientos estándar (Hood *et al.* 1993). Finalmente, los transformantes se cultivaron en placas que contenían LB medio modificado (10 g l₋₁ del bacto-peptone; 5 g l₋₁ de extracto de levadura; 2.5 g l₋₁ NaCl; 10 g l₋₁ de manitol) durante 48 horas a 28°C y, posteriormente, se seleccionaron colonias y se inocularon en plantas de tomate MM-Cf0 de cuatro semanas de edad y en plantas

35 de tomate MM-Cf4, mediante la técnica de inoculación con palillo (Hammond-

Kosack et al. 1995). Los síntomas sistémicos de HR se grabaron entre 10 y 14 días después de la inoculación (Fig. 6). Como controles, se utilizaron el PVX que contenía el vector pSfinx vacío (PVX::pSfinx) y el Avr4 de *C. fulvum* en un vector binario (PVX::PR1aAvr4). Esta última construcción ya estaba disponible en
5 nuestro laboratorio (Joosten et al. 1997).

REFERENCIAS

- 5 An G, Mitra A, Choi HK, Costa M.A, An K, Thornburg RW, Ryan CM. 1989. Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. *Plant Cell* 1:115-122.
- 10 Arzanlou M, Abeln ECA, Kema GHJ, Waalwijk C, Carlier J, de Vries I, Guzman M, Crous PW. 2007. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology* 97: 1112-1118.
- Batzler MA, Carlton JE Deininger PL 1991. Enhanced evolutionary PCR using oligonucleotides with inosine at the 3'-terminus. *Nucleic Acids Research* 19: 5081.
- 15 De Blaere, R., Reynaerts, A., Hofte, H., Hernalsteens, J.-P., Leemans, J. y Van Montagu, M. 1987. Vectors for cloning in plant cells *Methods in Enzymology* 153, 277-291.
- 20 Bolton MD, Van Esse HP, Vossen JH, De Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJE, Van Den Berg GCM, Borrás-Hidalgo O, Dekker HL, De Koster CG, De Wit PJGM, Joosten MHAJ, Thomma BPHJ. 2008. The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* 69:119-36
- Carlier J, Foure E, Gauhl F, Jones DR, Lepoivre P, Mourichon X, Pasberg-Gauhl C Romero RA. 2000. Black Leaf Streak. Páginas 37-79 in: Diseases of Banana, Abaca and Enset. D. R. Jones.
- 25 Christensen AH, Quail PH. 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5: 213-218.
- 30 Christou P, McCabe DE, Swain WF. 1988 Stable Transformation of Soybean Callus by DNA-Coated Gold Particles, *Plant Physiol.* 87: 671-674.
- 35 Christou P, Ford TL, Kofron M. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Trends in Biotechnology* 10: 239-246.
- Crossway, A, Oakes JV, Irvine JM, Ward B, Knauf VC, Shewmaker, LK 1986. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molec. Gen. Genet.* 202: 179-185.
- 40 Crouch JH, Vuylsteke D, Ortiz R. 1998. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.). *Electronic Journal of Biotechnology* 1:1-12.
- 45 Datta, SK, Datta, K, Potrykus, I 1990. Embryogenesis and plant regeneration from microspores of both Indica and Japonica rice (*Oryza sativa*). *Plant Sci.* 67: 83-88.
- De Kock MJD, Brandwagt BF, Bonnema G, De Wit PJGM, Lindhout P. 2005. The tomato Orion locus comprises a unique class of Hcr9 genes. *Molecular Breeding* 15:409-22.
- 50 De Kock MJD, Iskander HM, Brandwagt BF, Lauge R, De Wit PJGM, Lindhout P. 2004. Recognition of *Cladosporium fulvum* Ecp2 elicitor by non-host *Nicotiana* spp. is mediated by a single dominant gene that is not homologous to known Cf-genes. *Molecular Plant Pathology* 5: 397-408.
- 55 De Wit PJGM, Joosten MHAJ, Thomma BHPJ, Stergiopoulos I. 2008. Gene-for-gene models and beyond: the *Cladosporium fulvum*-tomato pathosystem. *The MycotaV; Plant relationships, 2nd Edition*, H.B. Deising (Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009. pp.135-156.
- 60 Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, Thomas CM, Harrison K, Jones JDG. 1996. The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* 84:451-59.

Fromm, ME, Taylor, LP, Walbot, V 1986 Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319, 791–793.

Fromm, ME, Morrish, F, Armstrong, C, Williams, R, Thomas, J and Klein, TM. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8: 833-839.

Gelvin SB, Habeck LL. 1990. *Vir* genes influence the conjugal transfer of the Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 172:1600-1608.

Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brien JV, Chambers SA, Adams Jr WR, Willetts NG, Rice TB, Mackey CJ, Krueger RW, Kausch AP, Lemaux PG. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell* 2:603-618

Haanstra JPW, Lauge R, Meijer-Dekens F, Bonnema G, de Wit PJGM, Lindhout P. 1999. The *Cf-ECP2* gene is linked to, but not part of, the *Cf-4/Cf-9* cluster on the short arm of chromosome 1 in tomato. *Molecular and General Genetics* 262: 839-845.

Hammond-Kosack KE, Harrison K, Jones JDG. 1994. Developmentally regulated cell death on expression of the fungal avirulence gene *Avr9* in tomato seedlings carrying the disease-resistance gene *Cf-9*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 91:10445-10449

Hammond-Kosack KE, Staskawicz BJ, Jones JDG, Baulcombe DC. 1995. Functional expression of a fungal avirulence gene from a modified potato virus X genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8:181-185.

Hermann SR, Becker DK, Harding RM Dale JL. 2001 Promoters derived from banana bunchy top virus-associated components S1 and S2 drive transgene expression in both tobacco and banana. *Plant Cell Reports* 20:642–646.

Hinchee MAW, Conner-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT, Horsch RB. 1988, Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology* 6:915-922.

Honée G, Buitink J, Jabs T, De Kloe, J, Sijbolts F, Apotheker M, Weide R, Sijen T, Stuiver M, De Wit PJGM. 1998. Induction of defence-related responses in *Cf9* tomato cells by the AVR9 elicitor peptide of *Cladosporium fulvum* is developmentally regulated. *Plant Physiology* 117:809-820.

Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Resources* 2:208-218.

Innis MA, Gelfand DH 1999: PCR Applications: protocols for functional genomics. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Jones DR. 1993. Evaluating banana and plantain for reaction to black leaf streak disease in the south-pacific. *Tropical Agriculture* 70: 39-44

Jones DR. 2000. Diseases of banana, abaca and enset. CABI International, Wallingford, Oxon, UK.

Joosten MHAJ, Cozijnsen TJ, De Wit PJGM. 1994. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* 367:384-86.

Joosten MHAJ, De Wit PJGM. 1999. The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* 37:335-67.

Joosten MHAJ, Vogelsang R, Cozijnsen TJ, Verberne MC, De Wit PJGM. 1997. The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents *Cf-4*-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. *Plant Cell* 9:367-79.

- Kao CY, Huang SH, Lin CM. 2008. A low-pressure gene gun for genetic transformation of maize (*Zea mays* L.). *Plant Biotechnology Reports* 2: 267-270.
- 5 Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.
- Klein TM, Wolf WD, Wu R, Sanford JC 1987: High velocity micro-projectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.
- 10 Kooman-Gersmann M, Vogelsang R, Vossen P, van den Hooven HW, Mahe E, Honeé G, De Wit PJGM. 1998. Correlation between binding affinity and necrosis-inducing activity of mutant Avr9 peptide elicitors. *Plant Physiol.* 117:609-18.
- 15 Klein, TM, Kornstein, L, Sanford, JC Fromm, ME 1989. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol.* 91: 440-444.
- Kozziel, MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dawson J, Desai N, Hill M, Kadwell S, Launis K, Lewis K, Maddox D, McPherson K, Meghji MR, Merlin E, Rhodes R, Warren GW, Wright M, Evola SV. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11:194-200.
- 20 Kruger J, Thomas CM, Golstein C, Dixon MS, Smoker M, Tang S, Mulder L, Jones JDG. 2002. A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science* 296:744-47.
- 25 Kruijt M, Kip DJ, Joosten MH AJ, Brandwagt BF, De Wit PJGM. 2005. The *Cf-4* and *Cf-9* resistance genes against *Cladosporium fulvum* are conserved in wild tomato species *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 1011-1021.
- 30 Last DI, Brettell RIS, Chamberlaine DA, Chaudhury AM, Larkin PJ, Marsh EL, Peacock WJ, Dennis ES. 1991. pEmu: An improved promoter for gene expression in cereal cells. *Theoretical Applied Genetics* 81: 581-588.
- 35 Laugé R, Goodwin PH, De Wit PJGM, Joosten MH AJ. 2000. Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. *Plant Journal* 23:735-45.
- 40 Luderer R, Rivas S, Nurnberger T, Mattei B, Van den Hooven HW, Van der Hoorn RAL, Romeis T, Wehrfritz JM, Blume B, Nennstiel D, Zuidema D, Vervoort J, De Lorenzo G, Jones JDG, De Wit PJGM, Joosten MH AJ. 2001. No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:867-76.
- 45 Luderer R, Takken FLW, De Wit PJGM, Joosten MH AJ. 2002. *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated Avr2 elicitor proteins. *Molecular Microbiology* 45:875-84.
- 50 Marín D, Ching LD, Romero RA. 1992. Efecto de la Sigatoka negra sobre la productividad del plátano. Páginas 85-86 in: Corporacion Bananera Nacional-Informe Anual 1991, San José, Costa Rica.
- McCabe, DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P 1988,. Stable Transformation of Soybean (Glycine Max) by Particle Acceleration. *Bio/Technology* 6:923
- 55 McElroy D, Zhang W, Cao J, Wu R. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* 2: 163-171.
- 60 Mitsuhashi I, Ugaki M, Hirochika H, Ohshima M, Murakami T, Gotoh Y, Katayose Y, Nakamura S, Honkura R, Nishimiya S, Ueno K, Mochizuki A, Tanimoto H, Tsugawa H, Otsuki Y, Ohashi Y. 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiology* 37: 49-59.

- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H and Shibuya N. 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 19613-19618.
- 5 Ohtsuka E, Matsuki S, Ikehara M, Takahashi Y, Matsubara K. 1985, An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions. *J Biol Chem.* 260: 2605-2608.
- 10 Paszkowski, J, Shillito, RD, Saul, M, Mandak, V, Hohn, T, Hohn, B Potrykus, I 1984. Direct gene transfer to plants, *EMBO J.* 3: 2717-2722.
- Riggs, CD Bates GW, 1986. Stable transformation of tobacco by electroporation: Evidence for plasmid concatenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602-5606.
- 15 Rooney HCE, van't Klooster JW, van der Hoorn RAL, Joosten MHAJ, Jones JDG, De Wit PJGM. 2005. *Cladosporium Avr2* inhibits tomato *Rcr3* protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* 308:1783-86.
- 20 Rossolini GM, Cresti S, Ingianni A, Catani P, Riccio ML, Satta G. 1994, Use of deoxyinosine-containing primers versus degenerate primers for polymerase chain reaction based on ambiguous sequence information. *Molecular and Cellular Probes*, 8: 91-98.
- 25 Sági L, Remy S, Swennen R 1998. Fungal disease control in banana, a tropical monocot: Transgenic plants in the third world? *Phytoprotection* (Suppl.) 79:117-120.
- Sági L, Remy S, Swennen R. 1997. Genetic transformation for the improvement of bananas: A critical assessment. Focus paper No. 2. Páginas 33-36 in: INIBAP Annual Report 1997. INIBAP, Montpellier, France.
- 30 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TA. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 35 Sanford, JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a microprojectile bombardment process. *J. Particle Sci. Technol.* 5:27-37.
- Schenk PM, Sagi L, Remans T, Dietzgen RG, Bernard MJ, Graham MW, Manners JM. 1999. A promoter from sugarcane bacilliform badnavirus drives transgene expression in banana and other monocot and dicot plants. *Plant Molecular Biology* 39: 1221-1230.
- 40 Schönmann PHD, Surin B Waterhouse PM. 2003. A suite of novel promoters and terminators for plant biotechnology II. The pPLEX series for use in monocots. *Functional Plant Biology* 30: 453-460.
- 45 Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chintla R, Harzen A, Colby T, Kamoun S, Van der Hoorn RA. 2008. Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cysteine proteases of tomato. *The Plant Cell* 20:1169-83.
- 50 Shimamoto, K, Terada, R, Izawa, T, Fujimoto, H 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338: 274-276.
- 55 Soumpourou E, Iakovidis M, Chartrain L, Lyall V, Thomas CM. 2007. The *Solanum pimpinellifolium* Cf-ECP1 and Cf-ECP4 genes for resistance to *Cladosporium fulvum* are located at the Milky Way locus on the short arm of chromosome 1. *Theoretical and Applied Genetics* 115:1127-36.
- 60 Stergiopoulos I, De Kock MJD, Lindhout P, De Wit PJGM. 2007. Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1271-83.
- Stover RH 1980. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Disease* 64:750-756.

Stover RH and Simmonds NW. 1987. Bananas. 3rd ed. Longman Scientific & Technical, Essex, England.

- 5 Stratton J, Chiruvolu V, Meagher M. 1998. High cell-density fermentation. In: Higgins DR, Cregg JM (eds) *Methods in molecular biology: Pichia protocols*. Humana, Totowa, pp 107–120
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990): Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8526–8530.
- 10 Takken LW, Luderer R, Gabriëls SHEJ, Westerink N, Lu R. De Wit PJGM, Joosten MHAJ. 2000. A functional cloning strategy, based on a binary PVX-expression vector, to isolate HR-inducing cDNAs of plant pathogens. *Plant Journal* 24:275-283.
- 15 Thomas CM, Balint-Kurti PJ, Jones DA and Jones JDG. 1996. Plant pathogen resistance genes and uses thereof. International Patent Application Number: PCT/GB96/01155.
- 20 Thomma BPHJ, Van Esse HP, Crous PW, De Wit PJGM. 2005. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Molecular Plant Pathology* 6:379-93.
- Vain P, Finer KR, Engler DE, Pratt RC, Finer JJ. 1996. Intronmediated enhancement of gene expression in maize (*Zea mays* L.) and bluegrass (*Poa pratensis* L.). *Plant Cell Reports* 15: 489-494.
- 25 Verdaguer B, de Kochko A, Beachy RN and Fauquet C. 1996. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology* 31:1129–1139.
- 30 van den Ackerveken GFJM, van Kan JA, Joosten MHAJ, Muisers JM, Verbakel HM, De Wit PJGM. 1993. Characterization of two putative pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6:210-15.
- 35 van den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MHAJ, Vervoort J, De Wit PJGM. 2006. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 19:1420-30.
- 40 van den Burg HA, Spronk CAEM, Boeren S, Kennedy MA, Vissers JPC, Vuister GW, De Wit PJGM, Vervoort J. 2004. Binding of the AVR4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions: The chitin-binding site of Avr4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* 279:16786-96.
- 45 van den Burg HA, Westerink N, Francoijs KJ, Roth R, Woestenenk E, Boeren S, De Wit PJGM, Joosten MHAJ, Vervoort J. 2003. Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *Journal of Biological Chemistry* 278:27340-46.
- 50 van Esse HP, Bolton MD, Stergiopoulos I, De Wit PJGM, Thomma BPHJ. 2007. The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1092-101.
- 55 van Esse HP, van 't Klooster JW, Bolton MD, Yadeta K, VanBaarlen P, Boeren S, Vervoort J, De Wit PJGM, Thomma BPHJ. 2008. The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *Plant Cell* 20: 1948-1963.
- 60 Van der Hoorn RAL, Laurent F, Roth R, De Wit PJGM. 2000. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced Necrosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:439-446.
- 60 Van den Hooven HW, Van den Burg HA, Vossen P, Boeren S, De Wit PJGM y Vervoort J. 2001. Disulfide bond structure of the AVR9 elicitor of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: Evidence for a cystine knot. *Biochemistry*, 40: 3458–3466.

van Kan JAL, van den Ackerveken GFJM, De Wit PJGM. 1991. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4:52-59.

- 5 Vasil, V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK.,. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10:667-674.

- 10 Wan J, Xu Zhang XC, Neece D, Ramonell KM, Cloug S, Kim SY, Stacey MG, Stacey G. 2008. A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell* 20:471-481.

- 15 Weeks, JT, Anderson OD, Blechl AE. 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.* 102:1077-1084.

- Weissinger, A, Tomes, D, Maddock, S, Fromm, M, Sanford, J. 1988, Maize transformation via micro-projectile bombardment, in *Molecular Biology: Genetic Improvements of Agriculturally Important Crops: Progress and Issues Meeting*, pp. 21-25, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- 20 Westerink N, Brandwagt BF, De Wit PJGM, Joosten MH AJ. 2004. *Cladosporium fulvum* circumvents the second functional resistance gene homologue at the Cf-4 locus (Hcr9-4E) by secretion of a stable *avr4E* isoform. *Molecular Microbiology* 54:533-45.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Wageningen Universiteit
de Wit, Peter JGM
Stergiopoulos, Ioannis
Kema, Gerrit HJ

10 <120> Método para incrementar la resistencia de una planta o parte de ella
a un agente patógeno, método para detectar la resistencia de una planta o
parte de ella a un agente patógeno y aplicaciones de los mismos.

<130> P88514PC00

15 <150> EP 09164957.4
<151> 2009-07-08

<160> 18

20 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 135
<212> PRT
<213> Cladosporium fulvum

25 <400> 1

30 Met His Tyr Thr Thr Leu Leu Leu Ser Thr Leu Leu Val Gly Thr Ala
1 5 10 15
Leu Ala Gln Pro Thr Asn Pro Pro Ala Lys Thr Pro Lys Lys Ala Pro
20 25 30
Lys Thr Gln Pro Tyr Asn Pro Cys Lys Pro Gln Glu Val Ile Asp Thr
35 35 40 45
Lys Cys Met Gly Pro Lys Asp Cys Leu Tyr Pro Asn Pro Asp Ser Cys
50 55 60
40 Thr Thr Tyr Ile Gln Cys Val Pro Leu Asp Glu Val Gly Asn Ala Lys
65 70 75 80
Pro Val Val Lys Pro Cys Pro Lys Gly Leu Gln Trp Asn Asp Asn Val
85 90 95
45 Gly Lys Lys Trp Cys Asp Tyr Pro Asn Leu Ser Thr Cys Pro Val Lys
100 105 110
50 Thr Pro Gln Pro Lys Pro Lys Lys Gly Gly Val Gly Gly Lys Lys Ala
115 120 125
Ser Val Gly His Pro Gly Tyr
130 135

55 <210> 2
<211> 121
<212> PRT
<213> Mycosphaerella fijiensis

60 <400> 2

65 Met Leu Ser Thr Thr Arg Ile Thr Leu Leu Ala Thr Phe Ala Leu Ala
1 5 10 15
Thr Thr Ser Tyr Ala Gly Thr Met Gln Val Arg Asp Thr Ala Pro Ala
20 25 30
70 Phe Val Cys Pro Ser Ala Asp Ile Thr Ala Thr Lys Cys Leu Gly Pro
35 40 45
P88514PC00

5 Lys Asp Cys Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Thr Cys Asn Gly Tyr Ile Gln
50 55 60

Cys Ser Pro Ala Asp Ala Ser Tyr Thr Thr Gly Ile Val His Glu Met
65 70 75 80

10 Pro Cys Pro Ser Gly Leu Gln Trp Asn Asp Asn Gln Lys Trp Cys Asp
85 90 95

Trp Pro Glu Asn Ser Thr Cys Gly Asn Thr Gly Gly Thr Ile Tyr Arg
100 105 110

15 Cys Asp Glu Thr Gly Cys Asp Asn Val
115 120

20 <210> 3
<211> 134
<212> PRT
<213> Cercospora nicotianae

25 <400> 3

Met Tyr Gly Leu Phe His Leu Ala Val Leu Ser Ala Thr Ala Leu Ser
1 5 10 15

30 Ala Ser Ala Leu Pro Gln Gln Gln Glu Lys Pro Gly Val Asn Ala Asp
20 25 30

Phe Ile Cys Pro Pro Glu Asp Met Lys Arg Thr His Cys Met Gly Pro
35 40 45

35 Phe Asp Cys Leu Tyr Ala Leu Pro Gly Asn Cys Leu Gly Tyr Ile Gln
50 55 60

Cys Gln Pro Lys Asp Glu Thr Tyr Glu Thr Gly Ile Ala Tyr Glu Arg
65 70 75 80

40 Pro Cys Arg Ala Gly Gln Trp Trp Asn Asp Glu Lys Lys Tyr Cys Asp
85 90 95

45 Thr Val Glu Pro Pro Thr Cys Lys Ala Pro Val Val Pro Ala Ser Ala
100 105 110

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
115 120 125

50 Ala Ser Thr Ser Pro Cys
130

55 <210> 4
<211> 135
<212> PRT
<213> Cercospora beticola

60 <400> 4

Met Tyr Gly Leu Phe His Leu Ala Val Leu Ser Ala Thr Ala Pro Ser
1 5 10 15

65 Ala Ser Ala Leu Pro Gln Gln Gln Glu Lys Pro Gly Val Asn Lys Asp
20 25 30

Phe Ile Cys Pro Pro Glu Asp Met Lys Arg Thr His Cys Met Gly Pro
35 40 45

70

Phe Asp Cys Leu Tyr Ala Leu Pro Gly Asn Cys Leu Gly Tyr Ile Gln
50 55 60

5 Cys Gln Pro Lys Asp Thr Thr Tyr Glu Thr Gly Ile Ala Tyr Glu Arg
65 70 75 80

Pro Cys Arg Ala Gly Gln Trp Trp Asn Asp Glu Lys Lys Tyr Cys Asp
85 90 95

10 Thr Val Val Pro Pro Thr Cys Lys Ala Pro Val Val Pro Ala Ser Ala
100 105 110

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala
115 120 125

15 Pro Ala Ser Thr Ser Pro Cys
130 135

20 <210> 5
<211> 134
<212> PRT
<213> Cercospora zeina

25 <400> 5

Met Tyr Gly Leu Phe His Leu Ala Val Leu Ser Ala Thr Ala Leu Ser
1 5 10 15

30 Ala Ser Ala Leu Pro Gln Gln Gln Glu Lys Pro Gly Val Asn Ala Asn
20 25 30

Phe Ile Cys Pro Pro Glu Asp Met Lys Arg Thr His Cys Met Gly Pro
35 40 45

35 Phe Asp Cys Leu Tyr Ala Leu Pro Gly Asn Cys Leu Gly Tyr Ile Gln
50 55 60

40 Cys Gln Pro Lys Asp Glu Thr Tyr Glu Thr Gly Ile Ala Tyr Glu Arg
65 70 75 80

Pro Cys Arg Ala Gly Gln Trp Trp Asn Asp Glu Lys Lys Tyr Cys Asp
85 90 95

45 Thr Val Glu Pro Pro Thr Cys Lys Ala Pro Val Val Pro Ala Ser Ala
100 105 110

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro
115 120 125

50 Ala Ser Thr Ser Pro Cys
130

55 <210> 6
<211> 135
<212> PRT
<213> Cercospora apii

60 <400> 6

Met Tyr Gly Leu Phe His Leu Ala Val Leu Ser Ala Thr Ala Pro Ser
1 5 10 15

65 Ala Ser Ala Leu Pro Gln Gln Gln Glu Lys Pro Gly Val Asn Lys Asp
20 25 30

Phe Ile Cys Pro Pro Glu Asp Met Lys Arg Thr His Cys Met Gly Pro
35 40 45

70

Phe Asp Cys Leu Tyr Ala Leu Pro Gly Asn Cys Leu Gly Tyr Ile Gln
50 55 60

5 Cys Gln Pro Lys Asp Thr Thr Tyr Glu Thr Gly Ile Ala Tyr Glu Arg
65 70 75 80

Pro Cys Arg Ala Gly Gln Trp Trp Asn Asp Glu Lys Lys Tyr Cys Asp
85 90 95

10 Thr Val Val Pro Pro Thr Cys Lys Ala Pro Val Val Pro Ala Ser Ala
100 105 110

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala
115 120 125

15 Pro Ala Ser Thr Ser Pro Cys
130 135

20 <210> 7
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> primer

30 <400> 7
gactacaagg acgacgatga caaggcaacg atgcaggtgc gaac 44

35 <210> 8
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> primer

40 <400> 8
tcagaattct tacagttgtc gcatcc 26

45 <210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> primer

<400> 9
gcaaatggca ttctgacatc c 21

55 <210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> primer

65 <400> 10
gactggttcc aattgacaag c 21

70 <210> 11
<211> 26
<212> ADN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> primer	
5	<400> 11 ggccatggga ttgtttctct ttccac	26
10	<210> 12 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220>	
	<223> primer	
	<400> 12 atthttgggca cggcaagag	19
20		
	<210> 13 <211> 37 <212> ADN <213> Artificial	
25		
	<220>	
	<223> primer	
30	<400> 13 cttgccgtgc ccaaaatgct ggaacgatgc aggtgcg	37
35	<210> 14 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220>	
	<223> primer	
	<400> 14 ggctcgagtt acacgttgtc gcatcctg	28
45		
	<210> 15 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
50		
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 15 ggcccggggc tggacgatgc aggtgcg	27
55		
	<210> 16 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
60		
	<220>	
	<223> primer	
65	<400> 16 ggctcgagtt acacgttgtc gcatcctg	28
70	<210> 17	

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> primer	
	<400> 17	
10	caatcacagt gttggcttgc	20
	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> primer	
20	<400> 18	
	gaccctatgg gctgtgttg	19

Reivindicaciones

1. Método para incrementar la resistencia de una planta o parte de ella susceptible a infección por un patógeno constituido de una región ortóloga de la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum*; dicho método comprende la transformación de dicha planta o parte de ella con un ácido nucleico que codifica el Cf4 o con un homólogo funcional del mismo, la planta en mención no es de tomate o de tabaco.
2. Método mencionado en la reivindicación 1, es caracterizado por una planta o parte de ella seleccionada a partir de un grupo de plantas: planta de banano, planta de trigo, planta de remolacha azucarera, planta de maíz y de apio
3. Método mencionado en la reivindicación 1 o 2, es caracterizado por el siguiente homólogo funcional: el péptido Hcr9-Avr4.
4. Método mencionado para cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por la transformación consiste en introducir un vehículo de ácidos nucleicos de entrega, de preferencia un vector de expresión.
5. Método mencionado en la reivindicación 4, caracterizado por el vector de expresión se refiere a un vector viral, de preferencia un adenovirus o un retrovirus.
6. Método utilizado para detectar la resistencia de una planta o parte de ella a, por lo menos, un patógeno consiste en:
 - a) detectar por lo menos un patógeno con la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum* o una región ortóloga de la proteína,
 - b) seleccionar por lo menos un patógeno que contenga la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum* o una región ortóloga de la proteína,
 - c) introducir por lo menos un patógeno dentro de la planta o parte de ella y,
 - d) detectar en dicha planta o parte de ella la ausencia o presencia de una respuesta de defensa a por lo menos un patógeno,la planta en mención no es de tomate o de tabaco.

7. Método mencionado en la reivindicación 6, caracterizado por una planta o parte de ella es seleccionada a partir de un grupo de plantas tales como de: banano, trigo, remolacha azucarera, maíz y apio.

8. Método mencionado en la reivindicación 6 o 7, caracterizado por la región ortóloga contiene un componente vinculante: la quitina, muy similar a la que hace parte de la gran familia de las proteínas de quitina CBM14.

9. Método mencionado en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la región ortóloga contiene una secuencia de aminoácidos es seleccionado a partir de un grupo compuesto de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, de preferencia seleccionados del grupo compuesto de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

10. Método mencionado en cualquier de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por un patógeno es un hongo, de preferencia un hongo Dothideomycete, el cual es preferentemente seleccionado a partir de un grupo compuesto de *Mycosphaerella fijiensis*, *Cercospora nicotianae*, *Cercospora beticola*, *Cercospora zeina*, y *Cercospora apii*, con la salvedad de que el patógeno no sea un *Cladosporium fulvum*.

11. Aplicación de un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para incrementar la resistencia de una planta o parte de ella a por lo menos un patógeno, la planta en mención no es de tomate o de tabaco.

12. Aplicación de un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para detectar la resistencia de una planta o parte de ella, a por lo menos un patógeno, la planta en mención no es de tomate o de tabaco.

13. Aplicación mencionada en la reivindicación 11 o 12, caracterizado por una planta o parte de ella es seleccionada a partir de un grupo de plantas tales como de: banano, trigo, remolacha azucarera, maíz y apio.

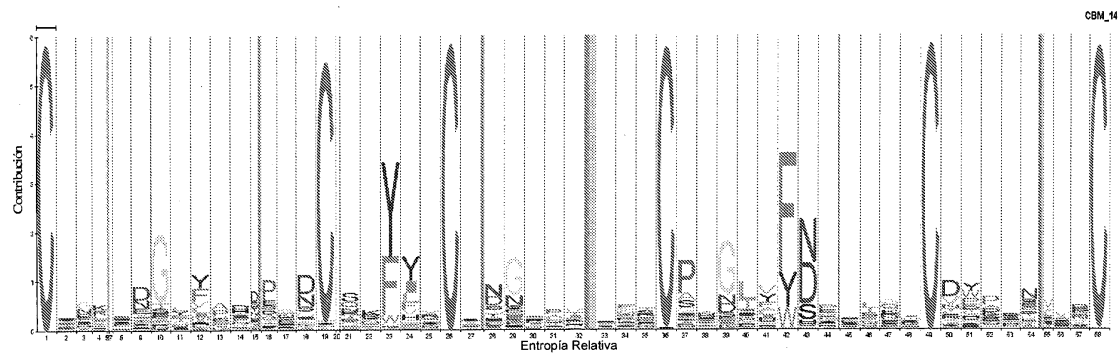
14. Aplicación mencionada en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado por un patógeno es un hongo, de preferencia un hongo Dothideomycete, el cual es preferentemente seleccionado a partir de un grupo compuesto de *Mycosphaerella fijiensis*, *Cercospora nicotianae*, *Cercospora beticola*,
5 *Cercospora zeina*, y *Cercospora apii*, con la salvedad de que el patógeno no sea un *Cladosporium* *fulvum*.
15. Método para incrementar la resistencia de una planta o parte de ella susceptible a infección por un patógeno, dicho patógeno es un Dothideomycete,
10 con la salvedad de que el patógeno no sea un *Cladosporium fulvum*, de preferencia seleccionado a partir de un grupo compuesto de *Mycosphaerella fijiensis*, *Cercospora nicotianae*, *Cercospora beticola*, *Cercospora zeina*, y *Cercospora apii*, dicho método comprende la transformación de una planta o parte de ella con un ácido nucleico que codifica el Cf4 o con un homólogo funcional del
15 mismo, la planta en mención no es de tomate o de tabaco, la planta es de preferencia caracterizada por una planta seleccionada a partir de un grupo de plantas tales como de: banano, trigo, remolacha azucarera, maíz y apio.

55
Título: Método para incrementar la resistencia de una planta o parte de ella a un agente patógeno, método para detectar la resistencia de una planta o parte de ella a un agente patógeno y aplicaciones de los mismos.

5 Resumen

La presente invención se relaciona al área de la biotecnología vegetal. En particular, la presente invención describe los métodos para incrementar la resistencia de una planta, o parte de ella, susceptible a infección por un patógeno
10 constituido de una región ortóloga de la proteína Avr4 de *Cladosporium fulvum*, la planta en mención no es de tomate o de tabaco. La invención también se relaciona con los métodos para detectar la resistencia de una planta, o parte de ella, a por lo menos un patógeno que no sea de *Cladosporium fulvum*, la planta en mención no es de tomate. Además, la invención describe la aplicación de los
15 métodos desarrollados.

Figura 1



52

Figure 2

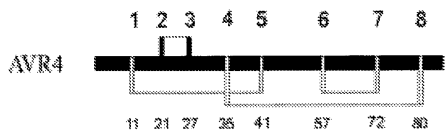


Figura 3

SEQ ID NO: 1	<i>C_fulvum_Avr4</i>	MYHTTLLSLLVGLTAQPTNPAPKTPKAPKTPQYNP	KPQVEIDTR MGPKK LYPN	60
SEQ ID NO: 2	<i>M_fijiensis_Avr4</i>	--MLSTTRITLLATFALATISYA---GTMQVRDAPAFV	PSADITAT LGPKK LYPN	65
SEQ ID NO: 3	<i>C_nicotiana_Avr4</i>	--MYGLFHLAVLSATALSALSALP---QQQEKPGVNADF	FPEDMKRIH MGFPD LIAL	55
SEQ ID NO: 4	<i>C_beticola_Avr4</i>	--MYGLFHLAVLSATALSALSALP---QQQEKPGVNKDF	FPEDMKRIH MGFPD LIAL	55
SEQ ID NO: 5	<i>C_zeina_Avr4</i>	--MYGLFHLAVLSATALSALSALP---QQQEKPGVNANF	FPEDMKRIH MGFPD LIAL	55
SEQ ID NO: 6	<i>C_apii_Avr4</i>	--MYGLFHLAVLSATALSALSALP---QQQEKPGVNKDF	FPEDMKRIH MGFPD LIAL	55
		::: * : :	::: * * * * *	
SEQ ID NO: 1	<i>C_fulvum_Avr4</i>	EDSCITIIYIQ VPLDEVGNAPVYK PCPKGLWQNDVNGKKV DYPNLST	VPKTPQPKP	118
SEQ ID NO: 2	<i>M_fijiensis_Avr4</i>	EKTIGNYIQ SPADASYITTGIVHEMP PSLGQWND--NOKW DWPENST	IGN-----	105
SEQ ID NO: 3	<i>C_nicotiana_Avr4</i>	FGN LGYIQ CPKDETYIETGIAYERP RAGQWVND--EKKY DTVPEPT	KAPVVPASA	112
SEQ ID NO: 4	<i>C_beticola_Avr4</i>	FGN LGYIQ CPKDTIYIETGIAYERP RAGQWVND--EKKY DTVPEPT	KAPVVPASA	112
SEQ ID NO: 5	<i>C_zeina_Avr4</i>	FGN LGYIQ CPKDETYIETGIAYERP RAGQWVND--EKKY DTVPEPT	KAPVVPASA	113
SEQ ID NO: 6	<i>C_apii_Avr4</i>	FGN LGYIQ CPKDTIYIETGIAYERP RAGQWVND--EKKY DTVPEPT	KAPVVPASA	113
		::: * * * * *	::: * * * * *	
SEQ ID NO: 1	<i>C_fulvum_Avr4</i>	---KKGGVGGKASVGHGPGY--	135	
SEQ ID NO: 2	<i>M_fijiensis_Avr4</i>	----TGGTIYRCDEITGCDNV--	121	
SEQ ID NO: 3	<i>C_nicotiana_Avr4</i>	APAPAPAPAPAPAPAPASTSPC	134	
SEQ ID NO: 4	<i>C_beticola_Avr4</i>	APAPAPAPAPAPAPAPASTSPC	135	
SEQ ID NO: 5	<i>C_zeina_Avr4</i>	APAPAPAPAPAPAPAPASTSPC	134	
SEQ ID NO: 6	<i>C_apii_Avr4</i>	APAPAPAPAPAPAPAPASTSPC	135	

Figura 5

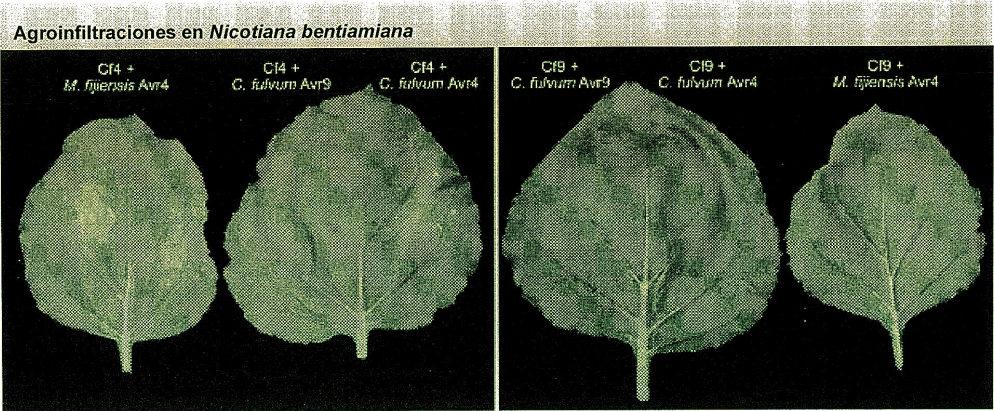


Figure 4

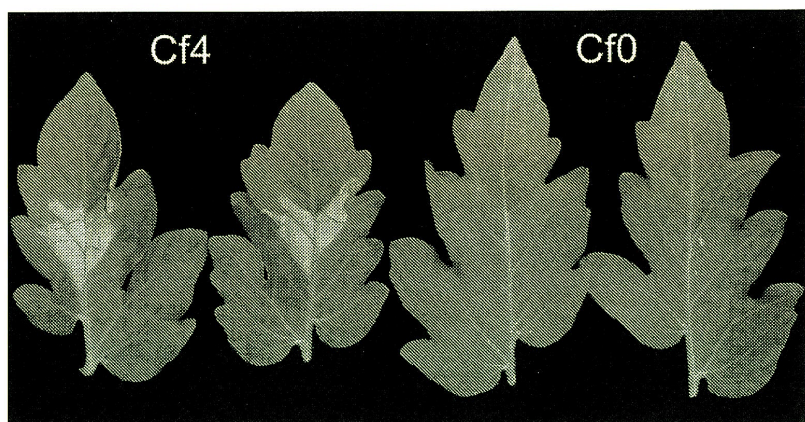


Figura 7

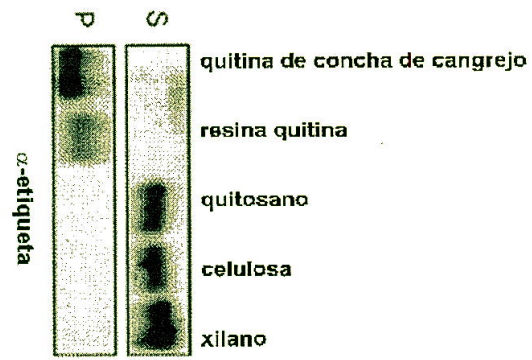
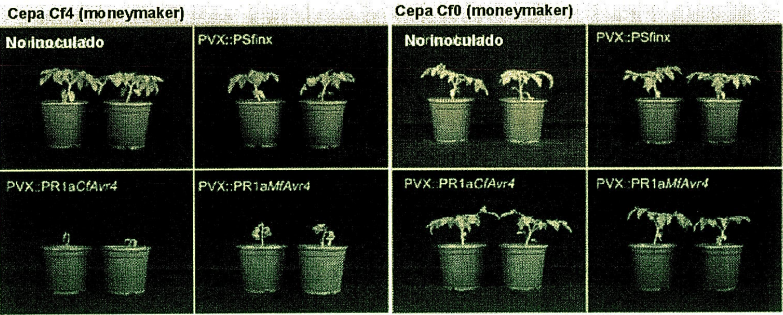


Figura 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/NL2010/050433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/415 C12N15/82
ADD.

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)

C07K C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/35790 A1 (INNES JOHN CENTRE INNOV LTD [GB]; THOMAS COLWYN MARTIN [GB]; BALINT KU) 14 November 1996 (1996-11-14) page 35 - page 37 page 46 - page 48	1-9, 11-13
A	TAKKEN F L W ET AL: "A FUNCTIONAL CLONING STRATEGY, BASED ON A BINARY PVX-EXPRESSION VECTOR, TO ISOLATE HR-INDUCING CDNAS OF PLANT PATHOGENS" PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 24, no. 2, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 275-283, XP001042390 ISSN: 0960-7412 ----- -/--	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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 such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 September 2010

Date of mailing of the international search report

29/09/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, Thomas

64

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/NL2010/050433

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VAN DER HOORN RENIER A L ET AL: "Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 13, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 439-446, XP002555466 ISSN: 0894-0282 -----	1-15
A	XIAO WENKAI ET AL: "Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (Zea mays L.)" THEORETICAL AND APPLIED GENETICS ; INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT BREEDING RESEARCH, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 113, no. 1, 11 April 2006 (2006-04-11), pages 63-72, XP019417687 ISSN: 1432-2242 -----	1-15
T	STERGIOPOULOS IOANNIS ET AL: "Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 107, no. 16, April 2010 (2010-04), pages 7610-7615, XP002599195 ISSN: 0027-8424 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No
PCT/NL2010/050433

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9635790	A1	14-11-1996	
		AU 702130 B2	11-02-1999
		AU 5699196 A	29-11-1996
		CA 2218554 A1	14-11-1996
		EP 0830451 A1	25-03-1998
		JP 11504521 T	27-04-1999
		US 6225527 B1	01-05-2001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 006168	
				Bogotá D.C., Enero 23 de 2012 - 07:49:39	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	127712240	20/01/2012	45.250.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00	
				\$590.000.00	
=====					
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____			SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO		
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
			No. 12-019943- -00000-0000		
			Fecha: 2012-02-06 11:26:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR		
			Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI		
			Act. 411 PRESENTACION Folios: 69		
Colo: 19075 - 841 - 001 - 2					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Enero 23 de 2012 - 07:49:53					

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 005035	
				Bogotá D.C., Enero 19 de 2012 - 12:03:23	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157712236	19/01/2012	22.810.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00	
				\$30.000.00	
			=====		
SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-019943- -00000-0000 Fecha: 2012-02-06 11:26:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 69					
Q610: 19075 - 841 - 001 - 2.					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Enero 19 de 2012 - 12:03:27					

Enero 27 de 2012 - 16:00:31

Fecha: 2012-02-06 11:26:36

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 69

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa	☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa	☐
Incompleta	☐