PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-039512- -00000-0000
Fecha: 2007-04-20 14:25:01
Tra: 11 PATENTEIYII
Act: 411 PRESENTACION
Dep: 2020 NUECREACION
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 339

# FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
# PCT
# ENTRADA EN FASE NACIONAL

**SOLICITUD DE:**

① 

[X] **Patente de Invención.** [ ] **Patente de Modelo de Utilidad.**

[X] **Capítulo I** [ ] **Capítulo II**

② **SOLICITANTE (71)**

Nombre: **VENGANZA INC.**

Dirección: **13115 Mill Crossing Court # 105, St. Louis, MO 63141, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

Nacionalidad o Domicilio: **St. Louis, MO, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

Lugar de Constitución: **ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

Teléfono: Fax:

E-mail:

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. [ ] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número

③ **REPRESENTANTE O APODERADO (74)**

Nombre: **MARGARITA CASTELLANOS A.**

Dirección: **CALLE 94A No. 7A-09**

Teléfono: **610 7420** Fax: **610 0706**

E-mail: info@castellanosyco.com

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. [X] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número **39'779.654** TPA **70,819**

④ **INVENTOR (ES) (72)**

Nombre: **CHARLES L. NIBLETT**

Dirección: **13115 Mill Crossing Court, # 105, Saint Louis, Missouri, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

Nacionalidad o Domicilio **ESTADOUNIDENSE**

⑤ **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. **PCT/US2005/038330** Fecha **21/10/2005**

Publicación Internacional No. **WO 2006/047495 A2** Fecha **04/05/2006**

⑥ **Título (54)** **METODOS Y MATERIALES PARA CONFERIR RESISTENCIA A LAS PESTES Y PATOGENOS DE PLANTAS**

⑦ **Clasificación Internacional (51)** A61K 31/00

⑧ **Prioridad**

SI [X] NO [ ]

| (33) País de Origen | (32) Fecha | (31) Número de Solicitud |
|---|---|---|
| US | 21/10/2004 | 60/621,542 |
| US | 01/03/2005 | 60/657,821 |
| | | |

⑨ **Comprobante de pago No.** 320-12-07- **Fecha** **Abri 20 de 2007**

**Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.**

## (10) Anexos

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [X] Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional 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.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros **Tarjeta Propietario y Extracto para la Publicación**

## (11) FIGURA CARACTERISTICA:

## (12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

FIRMA: Margarita Castellanos

**C.C. No. 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.**

20 ABR. 2007

**Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.** - MCA/gcb - P1481

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

PCT

(43) International Publication Date
4 May 2006 (04.05.2006)

(10) International Publication Number
WO 2006/047495 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:
PCT/US2005/038330

(22) International Filing Date: 21 October 2005 (21.10.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

| | | |
|---|---|---|
| 60/621,542 | 21 October 2004 (21.10.2004) | US |
| 60/657,821 | 1 March 2005 (01.03.2005) | US |

(71) Applicant and
(72) Inventor: **NIBLETT, Charles, L.** [US/US]; Venganza S.A., LLC., 13115 Mill Crossing Court, #105, St. Louis, MO 63141 (US).

(74) Agents: **LLOYD, Jeff.** et al.; Saliwanchik, Lloyd & Saliwanchik, P.O. Box 142950, Gainesville, FL 32614-2950 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 2006/047495 A2

(54) Title: METHODS AND MATERIALS FOR CONFERRING RESISTANCE TO PESTS AND PATHOGENS OF PLANTS

(57) Abstract: Methods and materials for conferring pest resistance to plants are provided. Plants are transformed with a silencing construct homologous to a gene of a plant pest that is essential for the survival, development, or pathogenicity of the pest. This results in the plant producing RNAi to the selected gene, which, when ingested by the pest results in silencing of the gene and a subsequent reduction of the pest's ability to harm the plant. In other embodiments, the pest's reduced ability to harm the plant is passed on to pest progeny. Methods and materials for depathogenesis of pests is also provided.

FIELD OF THE INVENTION ..... 5
SUMMARY OF THE INVENTION ..... 7
BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS ..... 9
BRIEF DESCRIPTION OF THE SEQUENCES ..... 10
DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION ..... 14
Definitions ..... 14
Pest pathogenicity gene homology ..... 19
Vectors ..... 22
Host plants ..... 23
Host Cell Types ..... 24
Pests ..... 26
Table 1 Pests – Bacteria ..... 26
Table 2 Pests - Downy Mildews ..... 27
Table 3 Pests - Parasitic Nematodes ..... 29
Table 4 Pests – Fungal ..... 30
Table 5 Pests – Rusts ..... 32
Pest pathogenicity genes ..... 33
Table 6 Pests, Pest pathogenicity genes, and Host Plants ..... 34
Sense (and antisense) Sequences ..... 35
Transforming Methods ..... 36
Pollination pathway ..... 37
Agrobacterium technology ..... 37
Microprojectile bombardment ..... 39
Electroporation ..... 41
Viral Vectors ..... 42
Marker genes ..... 43
Selectable markers ..... 44
Screenable Markers ..... 45
Marker Gene Strandedness ..... 46
Table 7 Heterologous polynucleotides ..... 48
Promoter and Regulatory Elements ..... 50
Terminator ..... 52
Plant Regeneration and Propagation ..... 52
Gene Stacking ..... 53
Depathogenesis ..... 54
Examples ..... 55
**Example 1. Cloning strategy** ..... 55
**Example 2. Construction of the intermediary plasmid pVZA1** ..... 56
**Example 3. Construction of the pVZA2, pVZA3, pVZA100, pVZA200, pVZA300 and pVZA400 plasmids** ..... 56
**Example 4. Transformation methods** ..... 59
**Example 5. Tobacco transformation with pVZA100 and regeneration** ..... 60
**Example 6. Fungal transformation and selection protocols** ..... 60
**Example 7. Transformation of corn, soybeans and potato** ..... 61
**Example 8. DNA and RNA extraction from plant and fungal tissues and PCR and RT/PCR protocols** ..... 62
**Example 9. Detection of siRNAs in plant and fungal tissues** ..... 63
**Example 10. GUS staining of plant and fungal tissues** ..... 64
**Example 11. Plant inoculation tests with fungi** ..... 64

**Example 12. Molecular characterization of P. nicotianae resistant tobacco plants** ..... 65
Table 8. Gene Detection and Expression in Transgenic and Wild Type Tobacco Plants ..... 66
**Example 13. Fungal transformation and characterization** ..... 67
Table 9. Gene Detection and Expression in Transgenic and Wild Type *Phytophthora nicotianae* ..... 68
**Example 14. Demonstration of gene silencing in tobacco by siRNA detection** ..... 70
**Example 15. Highly homologous Phytophthora cutinase sequences useful herein.** ..... 71
Table 10. The nucleotide sequences of the cutinase genes of 25 isolates comprising 9 species of Phytophthora. ..... 71
**Example 16. Intergeneric resistance in tobacco was conferred by the P. nicotianae cutinase gene-silencing to a disease caused by a Peronospora tabacina** ..... 76
Table 11. Reactions of Different Tobacco Genotypes to a Natural Epidemic of Blue Mold of Tobacco Caused by *Peronospora tabacina* in the Greenhouse ..... 77
Table 12. Taxonomic relationship between *Phytophthora nicotianae* and *Peronospora tabacina* ..... 78
**Example 17. Soybeans transformed and made resistant with Phytophthora gene silencing constructs** ..... 78
**Example 18 Potatoes transformed and made resistant to Phytophthora infestans.** ..... 79
**Example 19. Soybeans are made resistant to brown stem rot (Phialophora gregata rDNA)** ..... 79
**Example 20. Soybeans are made resistant to brown stem rot (Phialophora gregata genotype B DNA marker)** ..... 79
**Example 21. Soybeans are made resistant to stem and root rot (Phytophthora sojae cutinase)** ..... 80
**Example 22. Soybeans are made resistant to white mold disease (Sclerotinia sclerotiorum RNA polymerase subunit)** ..... 80
**Example 23. Soybeans are made resistant to white mold disease (Sclerotinia sclerotiorum hexose transporter)** ..... 80
**Example 24. Soybeans are made resistant to sudden death syndrome (Fusarium solani pisi cutinase)** ..... 81
**Example 25. Soybeans are made resistant to Asian rust (Phakopsora pachyrhizi cutinase homolog)** ..... 81
**Example 26. Soybeans are made resistant to Asian rust (Phakopsora pachyrhizi rDNA)** ..... 81
**Example 27. Testing of tobacco, soybean, potato and corn for transgenesis, resistance to Phytophthora spp. and resistance to aphids** ..... 81
Tobacco. ..... 81
pVZA100 in Soybean: ..... 82
pVZA100 in Potato ..... 82
pVZA100 in Corn ..... 83
pVZA200 in Potato ..... 83
pVZA300 in Potato ..... 83
pVZA300 in Soybeans ..... 84
pVZA400 in Soybeans ..... 85
pVZA400 in Potato ..... 85

Example 28. Potato is made resistant to tuber rot (Fusarium sambucinum translation elongation factor 1 alpha) ..... 86
Example 29. Tomato is made resistant to late blight (Phytophthora infestans elicitin gene) ..... 86
Example 30. Canola is made resistant to stem rot (Sclerotinia sclerotiorum RNA polymerase subunit) ..... 86
Example 31. Cotton is made resistant to cotton wilt (Fusarium solani pisi cutinase homolog) ..... 86
Example 32. Corn is made resistant to mycotoxins (F. solani pisi cutinase) ..... 87
Example 33. Corn is made resistant to stalk rot (Stenocarpella maydis rDNA) .. 87
Example 34. Corn is made resistant to leaf blight (Cercospora zeae-maydis 18s rDNA) ..... 87
Example 35. Potato is made resistant to green peach aphid (Myzus persicae cathepsin B protease) ..... 87
Example 36. Potato is made resistant to Colorado potato beetle (Leptinotarsa decemlineata cysteine protease) ..... 88
Example 37. Potato is made resistant to Verticillium wilt (V. dahliae rDNA) ..... 88
Example 38. Soybeans are made resistant to downy mildew (Peronospora berteroae rDNA) ..... 88
Example 39. Potato is made resistant to potato root knot nematode (Meloidogyne chitwoodi cytochrome oxidase II) ..... 89
Example 40. Soybeans are made resistant to nematode infestation (Pratylenchus scribneri and Heterodera glycines ribosomal RNA genes) ..... 89
Example 41. Various Plants are made resistant to infection by various Phytophthora spp. (Phytophthora nicotianae cutinase) ..... 90
Example 42. Agave is made resistant to Agave root rot (Fusarium solani pisi cutinase) ..... 90
Example 43. Rice is made resistant to blast disease (Magnaporthe grisea RNA polymerase II) ..... 91
Example 44. Various plants are made resistant to Phytophthora–induced root disease (Phytophthora citricola cutinase) ..... 91
Example 45. Barley is made resistant to barley leaf rust (Puccinia hordei 18S ribosomal RNA) ..... 91
Example 46. Barley is made resistant to downy mildew (Pseudoperonospora humuli rDNA) ..... 91
Example 47. Barley is made resistant to gray mold disease (Botrytis cinerea cytochrome P450 monoxygenase) ..... 92
Example 48. Tomato is made resistant to tomato speck disease (Pseudomonas syringae rDNA) ..... 92
Example 49. Tomato is made resistant to bacterial wilt (Clavibacter michiganense michiganense Cel A gene) ..... 92
Example 50. Corn is made resistant to Goss's bacterial wilt and blight (Clavibacter michiganense endo β-glucosidase gene ..... 92
Example 51. A silencing construct method to protect soybeans against one or two fungal diseases ..... 92
Example 52. A polycistronic silencing construct method to protect soybeans against three fungal diseases ..... 93
Example 53. Depathogenesis of Phytophthora species by feeding on transgenic plants or by direct transformation with pVZA 100, pVZA300 or pVZA400 ..... 93

**Example 54. Depathogenesis: Watermelon transformed with a cutinase silencing heterologous polynucleotide (F. oxysporum cutinase):** ..... 94
**Example 55. Broad Based Plant Resistance and Depathogenesis with ribosomal RNA silencing heterologous polynucleotides:** ..... 94
Table 13. GenBank sequences ribosomal DNA producing significant alignments with target species ..... 95
**Example 56. Control of multiple plant pests using multiple silencing heterologous polynucleotides** ..... 95
CLAIMS ..... 97
Abstract ..... 104

This Application claims priority to U.S. Provisional Application Ser. No 60/621,542 filed 21 October 2004 and U.S. Provisional Application Ser. No 60/657,821 filed 01 March 2005 both of which are hereby incorporated by reference herein in their entirety.

## FIELD OF THE INVENTION

Plant pests (e.g. fungal pathogens, bacteria, nematodes, insects, viruses, etc.) cause major losses of food and fiber throughout the world, especially in developing countries. Losses include direct production or pre-harvest losses, postharvest and storage losses, and the diminution of food quality and safety (e.g. by production of mycotoxins).

Other resultant losses from plant pests are observed in plants valued for aesthetic, olfactory, or ecologic properties.

Plant pests can sometimes be controlled by application of chemicals (e.g. fungicides, insecticides, nematicides, parasiticidals), manipulation or management of the microenvironment or by genes for resistance to the pathogen.

Discovery and introduction of a "new" gene for resistance frequently causes the development or selection of a new race of the pathogen able to infect plants containing that "new" gene. This has best been demonstrated by the rusts and smuts of cereal crops, but it also occurs with soil borne diseases such as black shank of tobacco and root and stem rot of soybean, caused by *Phytophthora nicotianae* and *P. sojae*, respectively. There are at least two races of *P. nicotianae* and more than 70 races of *P. sojae*, all requiring different genes or combinations of genes for disease resistance.

The fungal genus *Phytophthora* comprises many species of very destructive pathogens which cause serious diseases of plants. These include blights, damping-offs, cankers, fruit rots, root rots, wilts, and many other symptoms that affect a wide variety of food, fiber and oil

crops including avocado, cacao, canola, citrus, pepper, potato, soybean, tobacco, tomato, pine, rubber, oak trees, etc.

In the past decade the phenomenon of gene silencing or RNA interference (RNAi) has been described and characterized in organisms as diverse as plants, fungi, nematodes, hydra and humans (Zamore and Haley, 2005). It is considered to be an ancient defense mechanism wherein the host organism recognizes as foreign a double-stranded RNA molecule and hydrolyzes it. The resulting hydrolysis products are small RNA fragments of 21–30 nucleotides in length, called small interfering RNAs (siRNAs). The siRNAs then diffuse or are carried throughout the host, where they hybridize to the mRNA for that specific gene and cause its hydrolysis to produce more siRNAs. This process is repeated each time the siRNA hybridizes to its homologous mRNA, effectively preventing that mRNA from being translated, and thus "silencing" the expression of that specific gene.

Fire et al. (2003) describe a method of administering RNA to a host wherein the RNA is composed of sense and antisense sequences homologous to a gene of that host cell to silence that host cell's gene. US **6,506,559.**

Results by van West *et al.* (1999) demonstrated internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans.* They transformed *P. infestans* with the inf1 elicitin gene in both the sense and antisense orientations. This resulted in silencing of both of the transgenes, as well as the endogenous gene. By somatic fusion of a silenced transgenic strain and a wild-type strain, they demonstrated two essential points; first, that the presence of the transgene itself is not necessary to maintain the silenced state; and second, the involvement of a trans-acting factor capable of transferring the silencing signal between nuclei, later found to be the siRNAs.

Waterhouse et al. (WO9953050A1) have described methods of conferring viral resistance to a plant by transforming the plant with a gene silencing construct directed towards a plant viral gene.

Wang et al. (US20030180945A1) describe a method of gene silencing in a fungus by providing the fungus with a gene silencing construct directed towards a fungal gene.

What is needed in the art is a plant resistance method that is readily adaptable to changes in the biological environment such as a new and serious plant disease. For example, there were no occurrences of Asian rust in soybean in the USA until November 2004. Asian rust is predicted to cause losses estimated at 1 to 7 billion dollars (USDA) in 2005-2006.

The art would also be substantially advanced if there existed a versatile genetic method of conferring resistance to a plant against a spectrum of fungi, insects, nematodes, bacteria, etc.

## SUMMARY OF THE INVENTION

There is now provided in the present invention a method and constructs for conferring pest resistance to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene, and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence;

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence;

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length; and

wherein the antisense sequence is homologous to the pathogenicity gene of at least two pests from different species whereby the plant is resistant to said two pests as compared to substantially the same plant lacking the heterologous polynucleotide.

In another embodiment, the present invention provides a method and constructs for conferring pest resistance to a plant comprising a step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) a first antisense sequence having homology to a first pest pathogenicity gene;

(b) a second antisense sequence having homology to a second pest pathogenicity gene;

(c) a first sense sequence substantially complementary to said first antisense sequence; and

(d) a second sense sequence substantially complementary to said second antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the first antisense sequence and the first sense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the second antisense sequence and the second sense sequence, and

wherein said first and second sense sequences and first and second antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length.

Accordingly, a plant can now be made resistant to a plurality of pests belonging to the same or to different members selected from the group consisting of insects, bacteria, fungi, plants, and nematodes.

In another embodiment, the present invention provides a method and constructs for conferring pest resistance to a plant comprising a step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) a first promoter operably linked to an antisense sequence wherein said antisense sequence is homologous to a pest pathogenicity gene and operably linked to a terminator;

(b) a second promoter operably linked to a sense sequence wherein said sense sequence is substantially complementary to said antisense sequence and operably linked to a terminator;

wherein said second promoter is a strong promoter relative to the first promoter,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region between sequences encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length.

In another embodiment, the present invention provides a method and constructs for conferring pest resistance to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene, and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length,

wherein the pest is selected from the group consisting of insects, bacteria, fungi, and nematodes, and

wherein the pest pathogenicity gene and the pest are selected from those taught herein.

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

**Figure 1** is the genetic map of the pCAMBIA1201 plant transformation plasmid used as an example throughout this teaching and which is the backbone of pVZA100, pVZA200, pVZA300 and pVZA400.

**Figure 2** is a drawing of the insert in the intermediary plasmid pVZA1.

**Figure 3** is the pVZA100 silencing cassette cloned in plasmid pVZA3 and ready for transfer to pCAMBIA1201.

**Figure 4** is autoradiograms showing the siRNAs isolated from transgenic tobacco and from transgenic *Phytophthora nicotianae.* **Figures 4A and 4B** show the results of hybridization of the cutinase gene probe to siRNAs from wild type and transgenic tobacco plants and *P. nicotianae,* respectively.

**Figure 5** shows plant reactions to a natural epidemic of the blue mold disease of tobacco caused by *Peronospora tabacina* in the greenhouse.

**Figure 6** shows shoots emerging from transgenic soybean embryos.

**Figure 7** shows the results of soybean transformed with pVZA100. Fig 7A shows transformed soybean calli. Fig 7B show GUS and hygromycin phosphotransferase genes detected in the transformed soybean callus.

**Figure 8** shows roots and minitubers produced in the culture plates of potato cells transformed with pVZA100.

**Figure 9** shows a polycistronic gene silencing construct capable of silencing essential genes in three fungal species causing serious diseases of soybeans.

**Figure 10** shows gene silencing constructs based on rDNA and capable of silencing these essential genes in *Phytophthora*, in *Phakopsora* and in both species.

**Figure 11** shows a wild type tobacco plant (A) and a pVZA100 transgenic tobacco plant (B), susceptible and resistant to *Phytophthora nicotianae*, respectively.

**Figure 12** is an autoradiogram showing the siRNAs isolated from a transgenic tobacco plant (3) and from *Phytophthora nicotianae* growing on a silenced transgenic tobacco plant (4).

**Figure 13** shows transgenic soybean plants resistant to *Phytophthora sojae.*

**Figure 14** shows the effects of pVZA300 and pVZA400 on the growth and development of transgenic *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora sojae.*

BRIEF DESCRIPTION OF THE SEQUENCES

**SEQ ID NO: 1** is the PCR primer VZA 1F as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO: 2** is the PCR primer VZA 2R as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO: 3** is the PCR primer VZA 3F as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO: 4** is the PCR primer VZA 4R as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO: 5** is the silencing construct pVZA100 used according to the subject invention.

**SEQ ID NO: 6** is the silencing construct pVZA200 used according to the subject invention.

**SEQ ID NO: 7** is the silencing construct pVZA300 used according to the subject invention.

**SEQ ID NO: 8** is the silencing construct pVZA400 used according to the subject invention.

**SEQ ID NO: 9** is the forward PCR primer GUS as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO: 10** is the reverse PCR primer GUS as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO: 11** is the PCR primer pVZA100 and hygromycin phosphotrasferase as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO: 12** is the PCR primer pVZA100 and hygromycin phosphotrasferase as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 13** is the primer VZA 1 65R as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 14** is the primer VZA 2 69F as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 15** is the primer VZA 3 73F as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 16** is the primer VZA 3 73F as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 17** is the primer VZA 1 65 as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 18** is the primer VZA 6 70F as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 19** is the PCR primer VZA 7 72F as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 20** is the PCR primer VZA 8 79F as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 21** is the PCR VZA 9 84F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 22** is the PCR VZA 10 87F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 23** is the PCR VZA 11 89F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 24** is the PCR VZA 12 90F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 25** is the PCR VZA 13 91F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 26** is the PCR VZA 14 81F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 27** is the PCR VZA 15 82F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 28** is the PCR primer VZA 6 83F as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 29** is the PCR primer VZA 17 85F as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 30** is the PCR VZA 18 86F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 31** is the PCR VZA 19 64R primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 32** is the PCR VZA 20 77F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 33** is the PCR VZA 21 63F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 34** is the PCR VZA 22 66R primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 35** is the PCR VZA 23 80F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 36** is the PCR VZA 24 92F primer as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 37** is the PCR primer VZA 25 93F as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 38** is the PCR primer VZA 2R as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 39** is the PCR primer cathepsin as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 40** is the PCR primer elicitin as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 41** is the PCR primer rDNA FP as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 42** is the PCR primer rDNA RP as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 43** is the marker *Phialophora gregata* ribosomal RNA gene (rDNA) as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 44** is the genotype B DNA marker *Phialophora gregata* ribosomal RNA gene (rDNA) as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 45** is the polymerase II subunit *Sclerotinia sclerotiorum* partial rpb2 gene for RNA as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 46** is the ribosomal RNA gene *Puccinia hordei* 18S as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 47** is the hexose transporter (*hxt2*) gene *Sclerotinia sclerotiorum* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 48** is *Fusarium solani pisi* cutinase mRNA as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 49** is the genome or conserved protein motif of *Phytophthora nicotianae* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 50** is a ribosomal DNA sequence found in the *Phakopsora pachyrhizi* genome as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 51** is a *Fusarium sambucinum* translation elongation factor 1 alpha as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 52** is an elicitin gene sequence found in the *Phytophthora infestans* genome as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 53** is a partial rpb2 gene for RNA polymerase II subunit *Sclerotinia sclerotiorum* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 54** is rRNA *Stenocarpella maydis* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 55** is the 18S ribosomal RNA from a Cercospora zeae-maydis Group II as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 56** is Cathepsin B protease from *Myzus persicae* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 57** is cysteine protease from *Leptinotarsa decemlineata* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 58** is *Verticillium dahliae* rDNA as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 59** is partial sequence of 5.8S ribosomal RNA found in the *Peronospora berteroae* genome as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 60** is a genome subunit of cytochrome oxidase *Meloidogyne chitwoodi* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 61** is ribosomal RNA *P. scribneri* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 62** is ribosomal RNA *Heterodera glycines* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 63** is RNA polymerase II sequence *Magnaporthe grisea* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 64** is rRNA *Puccinia hordei* 18S as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 65** is the partial sequence 5.8S ribosomal RNA *Pseudoperonospora humuli* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 66** is *Botrytis cinerea* cytochrome P450 monoxygenase as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 67** is rRNA *Pseudomonas syingae* as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 68** is *Clavibacter michiganense michiganense* Cel A gene as used according to the subject invention.

**SEQ ID NO. 69** is *Clavibacter michiganense* endo B-glucosidase gene as used according to the subject invention.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

**Definitions**

As used herein, the following definitions apply:

Cell (or host plant cell) means a cell or protoplast of a plant cell and includes isolated cells and cells in a whole plant, plant organ, or fragment of a plant. It also includes non-isolated cells.

Double stranded region means a region of a polynucleotide wherein the nucleotides are capable of hydrogen bonding to each other. Such hydrogen bonding can be intramolecular or intermolecular (e.g. single transcription unit forming a double stranded region with the so-called hairpin or two transcription units that align appropriately for complementary sequences to hydrogen bond). To be a double stranded region, according to the present invention, it is not necessary for 100% of the nucleotides to be complementary and hydrogen bonded within a region. It is merely necessary for sufficient base pairing to occur to give the RNA a substantial double stranded character (e.g. an indicative melting point).

Exogenous gene means a gene that is not normally present in a given host genome in the present form. In this respect, the gene itself may be native to the host genome, however the exogenous gene will comprise the native gene altered by the addition or deletion of one or more different regulatory elements or additional genes.

Gene or genes means nucleic acid sequences (including both RNA or DNA) that encode genetic information for the synthesis of a whole RNA, a whole protein, or any functional portion of such whole RNA or whole protein sufficient to possess a desired characteristic.

Heterologous polynucleotide means any polynucleotide that is not found in a non-transformed host plant. A polynucleotide is not excluded from being a heterologous polynucleotide by the presence of endogenous polynucleotide sequences.

Homologous, in the context of the relationship between the antisense sequence and a pest pathogenicity gene (i.e. the DNA strand that binds RNA polymerase and directs transcription of the pest pathogenicity gene mRNA which is the antisense strand), means having sequence similarity sufficient to allow hybridization in vivo, in vitro, and/or ex vivo under low stringency conditions between the antisense sequence and the pest pathogenicity gene mRNA.

Host plant cell resistance means that a plant is less susceptible to the deleterious effects of a plant pest when compared to a host plant cell not transformed with said construct.

Inhibition of gene expression means a decrease in the level of protein and/or mRNA product from a target gene. The consequences of inhibition can be confirmed by examination of the outward properties of the cell or organism (as presented below in the examples) or by biochemical techniques such as RNA solution hybridization, nuclease protection, Northern hybridization, polymerase chain reaction (PCR), reverse transcription (RT) reverse transcription PCR (RT/PCR), gene expression monitoring with a microarray, antibody binding, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Western blotting, radioimmunoassay (RIA), other immunoassays, and fluorescence activated cell analysis (FACS).

Marker gene means a gene that imparts a distinct phenotype to a cell expressing the marker gene and thus allows such transformed cells to be distinguished from cells that do not contain the gene.

Operably linked means joined as part of the same nucleic acid molecule, suitably positioned and oriented for transcription to be initiated from the promoter.

Pest pathogenicity gene means any pest gene that serves a role in such a pest's deleterious effects on a host plant. Deleterious effects means, by way of example, a negative effect on plant growth (numbers and/or size of the plant), development, quality, and/or reproduction. By way of example only, a pest pathogenicity gene may be one that serves a role in any of pest growth, development, replication and/or reproduction, or pest invasion or infection of the host plant.

Pathogenic, in reference to a pest, means a pest's ability to cause deleterious effects on a plant. Pathogenicity is augmented by any pest pathogenicity genes.

Plant pest means any living organism that is deleterious to plant growth (numbers and/or size of the plant), development, quality, yield, and/or reproduction. Non-limiting examples of such pests are insects, fungi, nematodes, bacteria, and viruses.

Quality means any aspect of a plant that can be considered desirable. By way of non-limiting example, quality can refer to a plant's appearance, yield, flavor, nutritional value, aroma, or content.

Substantially complementary, with respect to the sense and antisense sequences means sufficiently complementary to allow for formation of a double stranded molecule.

Transformation means a process of introducing an exogenous DNA sequence (e.g., a vector, a recombinant DNA molecule) into a cell or protoplast in which that exogenous DNA

is incorporated into a chromosome or is capable of autonomous replication in a manner such that a heterologous RNA is transcribed.

Transcript means RNA encoded by DNA. In context of sense and antisense transcripts of the present invention, such sense and antisense transcripts can be part of the same polynucleotide or they can be 2 separate polynucleotides (i.e., each having its own 5' and 3' end).

Treating a plant pest means a method to reduce, eliminate, reverse, or prevent the deleterious effects of a plant pest on the plant.

Vector means a DNA molecule capable of replication in a host cell and/or to which another DNA segment can be operatively linked so as to bring about replication of the attached segment. A plasmid is an exemplary vector.

Underlying the various embodiments of the present invention is treating a plant to confer pest resistance by transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene, and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence;

wherein said sense and antisense sequences are capable of hybridizing to each other to form a double-stranded region and wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length.

Without being bound by theory, it is believed that plants transformed according to the present invention transcribe an RNA molecule(s) with a region homologous to and a region complementary to the pest pathogenicity gene, and wherein the transcript(s) form a double stranded RNA (dsRNA) molecule. The plant recognizes the dsRNA as a potential foreign substance (e.g. a substance of viral origin). The dicer enzyme of the plant cuts the double stranded RNA into pieces of single-stranded RNA of about 23 nucleotides in length, called small interfering RNAs (siRNAs). These siRNAs are consumed by invading pests that have entered the plant via the digestion of plant cells (e.g. cutin). Once absorbed, the siRNAs can be incorporated into the pest's RNA-induced silencing complexes (RISC). The RISC complex can then digest the mRNA of the pest's homologous gene limiting the pest's ability to harm the plant.

In one embodiment, pest resistance is conferred to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene, and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length,

wherein said pest pathogenicity gene is selected from the group consisting of cutinases, kinases, ribosomal RNAs, adhesins, elicitins, and G-proteins; and

wherein said pest is a fungus.

In one embodiment, pest resistance is conferred to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene; and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length,

wherein said pest pathogenicity gene is selected from the group consisting of kinases, ribosomal RNAs, G-proteins, moulting factors, serine proteases, cysteine proteases, and juvenile hormone esterases; and

wherein said pest is an insect.

In one embodiment, pest resistance is conferred to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene; and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length;

wherein said pest pathogenicity gene is selected from the group consisting of kinases, ribosomal RNAs, G-proteins, cuticle collagen proteins, and cathepsin proteases, and

wherein said pest is a nematode.

In one embodiment, pest resistance is conferred to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene; and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length,

wherein said pest pathogenicity gene is selected from the group consisting of cutinases, mascerating enzymes, kinases, ribosomal RNAs, adhesins, and G-proteins; and

wherein said pest is a bacterium.

In one embodiment, the host plant is a soybean and the pest is one member selected from the group consisting of *Fusarium solani* (e.g., sudden death), *Sclerotinia sclerotiorum* (e.g., white mold), *Phialophora gregata* (e.g., brown stem rot), *Phakospora pachyrhizi* (e.g., Asian rust) and *Phytophthora sojae* (e.g., root and stem rot).

In one embodiment, the host plant is a cruciferous plant and the pest is *Albugo* (e.g., white rust).

In one embodiment, the host plant is tobacco and the pest is *Phytophthora* (e.g., stem rot, root rot).

In one embodiment, the host plant is potato and the pest is *Phytophthora* (e.g., late blight).

In one embodiment, the host plant is broccoli and the is *Pythium* (e.g., damping-off).

In one embodiment, the host plant is pea and/or sugar beet and the pest is *Aphanomyces* (e.g., root rot).

In one embodiment, the host plant is tobacco and the pest is *Peronospora* (e.g., blue mold).

It has further been discovered that gene silencing in the pest according to the present invention, can be conferred upon the progeny of the pest – progeny that never had direct contact with the transformed host plant.

In one embodiment, the invention further comprises the step of cultivating a pest with the transformed host plant cell.

In one embodiment, a transformed host plant cell of the present invention is co-cultivated with a pest.

Optionally, progeny of the pest are less pathogenic to a plant cell other than the transformed host plant cell.

In one embodiment, a plant regenerated from a host plant cell transformed according to the present invention, is cultivated in soil contaminated with a pest.

In another embodiment, a plant regenerated from a host plant cell transformed according to the present invention, is cultivated in soil at risk of being contaminated with a pest.

In another embodiment, a pest is co-cultivated with a plant regenerated from a host plant cell transformed according to the present invention and then cultivated in soil contaminated with a pest.

In another embodiment, a pest is co-cultivated with a plant regenerated from a host plant cell transformed according to the present invention and then cultivated in soil at risk of being contaminated with a pest.

In one embodiment, a pest is co-cultivated with the transformed plant and then cultivated in soil at risk of being contaminated with a pest.

**Pest pathogenicity gene homology**

It has been further discovered that gene silencing according to the present invention can confer resistance to a surprisingly broad range of pests and that exact identity between a region of the sense sequence and the pest infectious gene is not required for the present invention to be effective.

In one embodiment of the present invention, the pest pathogenicity gene is a gene that provides for cross-resistance. Such a pest gene is conserved within the pest phylum such that when used with the present invention, a plant is made resistant to a plurality of members of the pest phylum (i.e. cross-resistance). Moreover, pest pathogenicity genes can be chosen according to the present invention by bioinformatic homology analysis as known to those skilled in the art to provide cross-resistance that is cross-species, cross-genus, cross-family, or cross-order resistance. For example, as will become clear from the examples herein, a cutinase gene is useful in plants to confer resistance to a plurality of fungi species. The gene for rDNA is useful in the pests of the present invention (i.e. insects, bacteria, fungi, and

nematodes). Other non-limiting examples of such conserved genes are kinases, adhesions, G-proteins, elicitins, macerating enzymes, DNA and RNA polymerases, elongation factors, moulting factors, serine proteases, cysteine proteases, juvenile hormone esterase, cuticle collagen proteins, and cathepsin proteases and others set forth below. In another embodiment, a pest pathogenicity gene is selected to lack sufficient homology with a plant gene to cause harmful effects of the heterologous polynucleotide on the host plant (e.g. prevent silencing of a plant gene). For example, in one embodiment, the homology between the antisense sequence and the pest pathogenicity gene is less than about 70%.

In one embodiment, the antisense sequence is homologous to the pest pathogenicity gene by at least about 70%.

Optionally, the homology is at least about 75%.

Optionally, the homology is at least about 80%.

Optionally, the homology is at least about 85%.

Optionally, the homology is at least about 90%.

Optionally, the homology is at least about 95%.

In one embodiment, a transcript of the sense sequence is homologous to a transcript of the pest pathogenicity gene (e.g. pest pathogenicity gene mRNA) by at least about 70%.

Optionally, the homology is at least about 75%.

Optionally, the homology is at least about 80%.

Optionally, the homology is at least about 85%.

Optionally, the homology is at least about 90%.

Optionally, the homology is at least about 95%.

The above-mentioned homology can optionally extend over a stretch of at least about 20 nucleotides, or at least about 25 nucleotides, or at least about 50 nucleotides, or at least about 100 nucleotides.

Optionally, homology can be demonstrated between the antisense sequence and the pest pathogenicity gene (i.e. the DNA strand that binds RNA polymerase and directs transcription of the pest pathogenicity gene mRNA) in any of at least three ways.

(1) hybridization between the antisense sequence and corresponding region of the pest gene sense strand.

(2) hybridization between the antisense transcript and the corresponding region of the pest pathogenicity gene.

(3) hybridization between a transcript of a DNA complentary to the antisense sequence (i.e. antisense cDNA) and a corresponding region of the pest pathogenicity gene mRNA.

Hybridization, as set forth above, can be demonstrated under conditions of low stringency. Optionally, the conditions are ones of moderate to high stringency by techniques well known in the art, as described, for example, in Keller, G.H., M.M. Manak (1987) DNA Probes, Stockton Press, New York, NY, pp. 169-170.

Examples of moderate to high stringency conditions are provided herein. Specifically, hybridization of immobilized DNA on Northern blots with 32P-labeled gene-specific probes is performed using standard methods (Maniatis *et al.*). In general, hybridization and subsequent washes are carried out under moderate to high stringency conditions that allowed for detection of target sequences with homology to sequences exemplified herein. For double-stranded DNA gene probes, hybridization was carried out overnight at 20-25 °C below the melting temperature (Tm) of the DNA hybrid in 6X SSPE, 5X Denhardt's solution, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml denatured DNA. The melting temperature is described by the following formula from Beltz *et al.* (1983): Tm=81.5 °C+16.6 Log[Na+]+0.41(%G+C)-0.61(% formamide)-600/length of duplex in base pairs.

Washes are typically carried out as follows:

(1) Twice at room temperature for 15 minutes in 1X SSPE, 0.1% SDS (low stringency wash).

(2) Once at Tm-20 °C for 15 minutes in 0.2X SSPE, 0.1% SDS (moderate stringency wash).

For oligonucleotide probes, hybridization was carried out overnight at 10-20 °C below the melting temperature (Tm) of the hybrid in 6X SSPE, 5X Denhardt's solution, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml denatured DNA. Tm for oligonucleotide probes was determined by the following formula from Suggs *et al.* (1981): Tm (°C)=2(number T/A base pairs) +4(number G/C base pairs).

Washes were typically carried out as follows:

(1) Twice at room temperature for 15 minutes 1X SSPE, 0.1% SDS (low stringency wash).

(2) Once at the hybridization temperature for 15 minutes in 1X SSPE, 0.1% SDS (moderate stringency wash).

In general, salt and/or temperature can be altered to change stringency. With a labeled DNA fragment of greater than about 70 or so bases in length, the following conditions can be used:

| | |
|---|---|
| Low: | 1 or 2X SSPE, room temperature |
| Low: | 1 or 2X SSPE, 42° C |
| Moderate: | 0.2X or 1X SSPE, 65° C |
| High: | 0.1 X SSPE, 65° C. |

Duplex formation and stability depend on substantial complementarity between the two strands of a hybrid, and, as noted above, a certain degree of mismatch can be tolerated. Therefore, polynucleotide sequences useful in the subject invention include mutations (both single and multiple), deletions, and insertions in the described sequences, and combinations thereof, wherein said mutations, insertions, and deletions permit formation of stable hybrids with a target polynucleotide of interest. Mutations, insertions, and deletions can be produced in a given polynucleotide sequence using standard methods known in the art. Other methods may become known in the future.

The mutational, insertional, and deletional variants of the polynucleotide sequences of the invention can be used in the same manner as the exemplified polynucleotide sequences so long as the variants have substantial sequence similarity with the original sequence. As used herein, substantial sequence similarity refers to the extent of nucleotide similarity that is sufficient to enable the variant polynucleotide to function in the same capacity as the original sequence. Preferably, this similarity is greater than 75%; more preferably, this similarity is greater than 90%; and most preferably, this similarity is greater than 95%. The degree of similarity needed for the variant to function in its intended capacity will depend upon the intended use of the sequence. It is well within the skill of a person trained in this art to make mutational, insertional, and deletional mutations that are designed to improve the function of the sequence or otherwise provide a methodological advantage.

**Vectors**

Those skilled in the art are well able to construct vectors of the present invention (including those based on naked DNA) and design protocols for recombinant gene expression. For further details see, for example, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Such applicable techniques and protocols for manipulation of nucleic acid, for example in preparation of nucleic acid constructs, mutagenesis, sequencing, introduction of DNA into cells and gene expression, and

analysis of proteins, are described in detail in Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

Specific procedures and vectors previously used with wide success upon plants are described by Bevan, Nucl. Acids Res. (1984) 12, 8711-8721), and Guerineau and Mullineaux, (1993). Plant transformation and expression vectors. In: Plant Molecular Biology Labfax (Croy RRD ed). Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148.

Vectors according to the present invention may be provided isolated and/or purified (i.e. from their natural environment), in substantially pure or homogeneous form, or free or substantially free of other nucleic acid. Nucleic acid according to the present invention may be wholly or partially synthetic.

**Host plants**

The present invention may be used for transformation of any plant, including, but not limited to, corn (*Zea mays*), canola (*Brassica napus, Brassica rapa ssp.*), alfalfa (*Medicago sativa*), rice (*Oryza sativa*), rye (*Secale cereale*), sorghum (*Sorghum bicolor, Sorghum vulgare*), sunflower (*Helianthus annuus*), wheat (*Triticum aestivum*), soybean (*Glycine max*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), potato (*Solanum tuberosum*), peanuts (*Arachis hypogaea*), cotton (*Gossypium hirsutum*), sweet potato (*Ipomoea batatus*), cassava (*Manihot esculenta*), coffee (*Cofea ssp.*), coconut (*Cocos nucifera*), pineapple (*Ananas comosus*), citrus trees (*Citrus spp.*), cocoa (*Theobroma cacao*), tea (Camellia sinensis), banana (Musa spp.), avocado (*Persea americana*), fig (*Ficus casica*), guava (*Psidium guajava*), mango (Mangifera *indica*), olive (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), cashew (*Anacardium occidental*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almond (*Prunus amygdalus*), sugar beets (*Beta vulgaris*), oats, barley, vegetables, ornamentals, and conifers.

Optionally, plants of the present invention are crop plants (for example, cereals and pulses, maize, wheat, potatoes, tapioca, rice, sorghum, millet, cassava, barley, pea, and other root, tuber, or seed crops. Important seed crops for the present invention are oil-seed rape, sugar beet, maize, sunflower, soybean, and sorghum. Horticultural plants to which the present invention may be applied may include lettuce, endive, and vegetable brassicas including cabbage, broccoli, and cauliflower, and carnations, geraniums, petunias, and begonias. The present invention may be applied to tobacco, cucurbits, carrot, strawberry, sunflower, tomato, pepper, chrysanthemum, poplar, eucalyptus, and pine.

Optionally, plants of the present invention include grain seeds, such as corn, wheat, barley, rice, sorghum, rye, etc.

Optionally, plants of the present invention include oil-seed plants. Oil seed plants include canola, cotton, soybean, safflower, sunflower, *Brassica*, maize, alfalfa, palm, coconut, etc.

Optionally, plants of the present invention include leguminous plants. Leguminous plants include beans and peas. Beans include guar, locust bean, fenugreek, soybean, garden beans, cowpea, mung bean, lima bean, fava bean, lentils, chickpea, etc.

Host plants useful in the present invention are row crops and broadcast crops. Non limiting examples of useful row crops are corn, soybeans, cotton, amaranth, vegetables, rice, sorghum, wheat, milo, barley, sunflower, durum, and oats.

Non-limiting examples of useful broadcast crops are sunflower, millet, rice, sorghum, wheat, milo, barley, durum, and oats.

Host plants useful in the present invention are monocots and dicots.

Non-limiting examples of useful monocots are rice, corn, wheat, palm trees, turf grasses, barley, and oats.

Non-limiting examples of useful dicots are soybean, cotton, alfalfa, canola, flax, tomato, sugar beet, sunflower, potato, tobacco, corn, wheat, rice, lettuce, celery, cucumber, carrot, cauliflower, grape, and turf grasses.

Host plants useful in the present invention include plants cultivated for aesthetic or olfactory benefits. Non limiting examples include flowering plants, trees, grasses, shade plants, and flowering and non-flowering ornamental plants.

Host plants useful in the present invention include plants cultivated for nutritional value.

**Host Cell Types**

One skilled in the art will recognize the wide variety of host cells that can be contacted with the heterologous polynucleotides according to the present invention. Non-limiting examples of such cells are those in embryogenic tissue, callus tissue types I, II, and III, hypocotyl, meristem, root tissue, tissues for expression in phloem, and the like.

Host plant cells can optionally be enriched for cells with a higher potential to be transformed and/or a higher potential to regenerate mature plants. Manual selection of host plant cells, e.g., by selecting embryogenic cells from the surface of a Type II callus, is one means that may be used to enrich for host plant cells prior to culturing (whether cultured on solid media or in suspension). Optionally, cells can be selected from those located at the surface of a cell cluster, and may further be identifiable by their lack of differentiation, their

size and dense cytoplasm. In one embodiment, host plant cells are less differentiated, or not yet committed to differentiation. Thus, in one embodiment, cells are identified and selected from those cells which are cytoplasmically dense, relatively unvacuolated with a high nucleus to cytoplasm ratio (e.g., determined by cytological observations), small in size (e.g., 10-20 μm), and capable of sustained divisions and somatic proembryo formation.

Optionally, host plant cells are identified through the use of dyes, such as Evan's blue, which are excluded by cells with relatively non-permeable membranes, such as embryogenic cells, and taken up by relatively differentiated cells such as root-like cells and snake cells (so-called due to their snake-like appearance).

Optionally, host plant cells are identified through the use of isozyme markers of embryogenic cells, such as glutamate dehydrogenase, which can be detected by cytochemical stains (Fransz et al., 1989). One skilled in the art will recognize that isozyme markers such as glutamate dehydrogenase may lead to some degree of false positives from non-embryogenic cells such as rooty cells which nonetheless have a relatively high metabolic activity.

Almost all plant tissues may be transformed during dedifferentiation using appropriate techniques described herein. Recipient cell targets include, but are not limited to, meristem cells, Type I, Type II, and Type III callus, immature embryos and gametic cells such as microspores, pollen, sperm, and egg cells. It is contemplated that any cell from which a fertile plant may be regenerated is useful as a recipient cell. Type I, Type II, and Type III callus may be initiated from tissue sources including, but not limited to, immature embryos, immature inflorescenses, seedling apical meristems, microspores, and the like.

Those cells that are capable of proliferating as callus also are recipient cells for genetic transformation. The present invention provides techniques for transforming immature embryos and subsequent regeneration of fertile transgenic plants. Direct transformation of immature embryos obviates the need for long term development of recipient cell cultures. Pollen, as well as its precursor cells, microspores, may be capable of functioning as recipient cells for genetic transformation, or as vectors to carry foreign DNA for incorporation during fertilization. Direct pollen transformation would obviate the need for cell culture.

Meristematic cells (i.e., plant cells capable of continual cell division and characterized by an undifferentiated cytological appearance, normally found at growing points or tissues in plants such as root tips, stem apices, lateral buds, etc.) may represent another type of recipient plant cell. Because of their undifferentiated growth and capacity for organ differentiation and totipotency, a single transformed meristematic cell could be recovered as a whole transformed plant. In fact, it is proposed that embryogenic suspension cultures may be an in vitro

meristematic cell system, retaining an ability for continued cell division in an undifferentiated state, controlled by the media environment.

**Pests**

Plant pests useful in the present invention (i.e., can be rendered non-pathogenic according to the present invention), include fungi, nematodes, insects, bacteria, and parasitic plants such as striga, dodder and mistletoe.

Non-limiting examples of useful fungi include those set forth in Table 4.

Non-limiting examples of such useful nematodes include those set forth in Table 3.

Non-limiting examples of such useful insects include aphids, leafhoppers, planthoppers, mealy bugs, and *Lepidoptera* larvae.

Plant pests usefully treated by the present invention include bacteria. Non-limiting examples of such bacteria are shown in Table 1.

Plant pests usefully treated by the present invention includes rusts. Non-limiting examples of such rust are shown in Table 5.

Plant pests usefully treated by the present invention include the downy mildews. Non-limiting examples of such are shown in Table 2.

**Table 1 Pests – Bacteria**

| Disease | Causative Agent |
|---|---|
| Bacterial leaf blight and stalk rot | *Pseudomonas avenae subsp.avenae* |
| Bacterial leaf spot | *Xanthomonas campestris pv.holcicola* |
| Bacterial stalk rot | *Enterobacter dissolvens = Erwinia dissolvens* |
| Bacterial stalk and top rot | *Erwinia carotovora subsp. carotovora, Erwinia chrysanthemi pv. Zeae* |
| Bacterial stripe | *Pseudomonas andropogonis* |
| Chocolate spot | *Pseudomonas syringae pv. Coronafaciens* |
| Goss's bacterial wilt and blight(leaf freckles and wilt) | *Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis = Corynebacterium michiganense pv. Nebraskense* |
| Holcus spot | *Pseudomonas syringae pv. Syringae* |
| Purple leaf sheath | *Hemiparasitic bacteria + (See under Fungi)* |
| Seed rot-seedling blight | *Bacillus subtilis* |
| Stewart's disease (bacterial wilt) | *Pantoea stewartii = Erwinia stewartii* |
| Corn stunt (Mesa Central or Rio Grande stunt) | *achapparramiento, stunt, Spiroplasma kunkelii* |

[0001]

**Table 2 Pests - Downy Mildews**

| Disease | Causative Agent |
|---|---|
| Brown stripe downy mildew | *Sclerophthora rayssiae var. zeae* |
| Crazy top downy mildew | *Sclerophthora macrospora = S. macrospore* |
| Green ear downy mildew | *Sclerospora graminicola* |
| Java downy mildew | *Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis* |
| Philippine downy mildew | *Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis* |
| Sorghum downy mildew | *Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi* |
| Spontaneum downy mildew | *Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea* |
| Sugarcane downy mildew | *Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari* |
| Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot) | *Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)* |
| Ear rots, minor | *Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydicus, Rhizopus microsporus, R. stolonifer = R. nigricans, Scopulariopsis brumptii* |
| Ergot (horse's tooth, diente del caballo) | *Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.)* |
| Eyespot | *Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae* |
| Fusarium ear and stalk rot | *Fusarium subglutinans = F. moniliforme var. subglutinans* |
| Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight | *Fusarium moniliforme teleomorph: Gibberella fujikuroi)* |
| Fusarium stalk rot, seedling root rot | *Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea)* |
| Gibberella ear and stalk rot | *Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)* |
| Gray ear rot | *Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)* |
| Gray leaf spot | *Cercospora leaf spot) Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis* |
| Helminthosporium root rot | *Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria* |
| Hormodendrum ear rot | *(Cladosporium Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides,rot), C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)* |
| Hyalothyridium leaf spot | *Hyalothyridium maydis* |
| Late wilt | *Cephalosporium maydis* |

| | |
|---|---|
| Leaf spots, minor | *Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporiella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina* |
| Northern corn leaf blight | *Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Setosphaeria turcica* |
| Northern corn leaf spot | *Cochliobolus carbonum* |
| Helminthosporium ear rot (race 1) | *Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum* |
| Penicillium ear rot (blue eye, blue mold) | *Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum* |
| Phaeocytostroma stalk rot and root rot | *Phaeocytostroma ambiguum, Phaeocytosporella zeae* |
| Phaeosphaeria leaf spot | *Phaeosphaeria maydis, Sphaerulina maydis* |
| Physalospora ear rot | *Botryosphaeria Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola, (anamorph: Diplodia frumenti)* |
| Purple leaf sheath | *Hemiparasitic bacteria and fungi* |
| Pyrenochaeta stalk rot and root rot | *Phoma terrestris, Pyrenochaeta terrestris* |
| Pythium root rot | *Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola* |
| Pythium stalk rot | *Pythium aphanidermatum = P. butleri L.* |
| Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot) | *Epicoccum nigrum* |
| Rhizoctonia ear rot | *Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)* |
| Rhizoctonia root rot and stalk rot | *Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae* |
| Root rots, minor | *Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, F. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus* |
| Rostratum leaf spot (leaf disease, ear and stalk rot) | *Setosphaeria rostrata,Helminthosporium (anamorph: Exserohilum rostratum = Helminthosporium rostratum)* |
| Rust, common corn | *Puccinia sorghi* |
| Rust, southern corn | *Puccinia polysora* |
| Rust, tropical corn | *Physopella pallescens, P. zeae = Angiopsora zeae* |

| | |
|---|---|
| Sclerotium ear rot (southern blight) | *Sclerotium rolfsii (teleomorph: Athelia rolfsii)* |
| Seed rot-seedling blight | *Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicillatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zeae (anamorph: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.* |
| Selenophoma leaf spot | *Selenophoma sp.* |
| Sheath rot | *Gaeumannomyces graminis* |
| Shuck rot | *Myrothecium gramineum* |
| Silage mold | *Monascus purpureus, M. rubber* |
| Smut, common | *Ustilago zeae = U. maydis* |
| Smut, false | *Ustilaginoidea virens* |
| Smut, head | *Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holci-sorghi* |
| Southern corn leaf blight and stalk rot | *Cochliobolus heterostrophus(anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)* |
| Southern leaf spot | *Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora* |
| Stalk rots, minor | *Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematococca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopographus zeae, Spicaria sp.* |
| Storage rots | *Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi* |
| Tar spot | *Phyllachora maydis* |
| Trichoderma ear rot and root rot | *Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.* |
| White ear rot, root and stalk rot | *Stenocarpella maydis = Diplodia zeae* |
| | |
| Yellow leaf blight | *Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)* |
| Zonate leaf spot | *Gloeccercospora sorghi* |

[0002]

**Table 3 Pests - Parasitic Nematodes**

| Disease | Pathogen |
|---|---|
| Awl | *Dolichodorus spp., D. heterocephalus* |
| Bulb and stem (Europe) | *Ditylenchus dipsaci* |
| Burrowing | *Radopholus similes* |
| Cyst | *Heterodera avenae, H. zeae, Punctodera chalcoensis* |

| | |
|---|---|
| Dagger | *Xiphinema spp., X. americanum, X. Mediterraneum* |
| False root-knot | *Nacobbus dorsalis* |
| Lance, Columbia | *Hoplolaimus Columbus* |
| Lance | *Hoplolaimus spp., H. galeatus* |
| Lesion | *Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zeae* |
| Needle | *Longidorus spp., L. breviannulatus* |
| Ring | *Criconemella spp., C. ornata* |
| Root-knot | *Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica* |
| Spiral | *Helicotylenchus spp.* |
| Sting | *Belonolaimus spp., B. longicaudatus* |
| Stubby-root | *Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.* |
| Stunt | *Tylenchorhynchus dubius* |

[0003]

**Table 4 Pests – Fungal**

| Disease | Fungal Pest |
|---|---|
| Anthracnose leaf blight and anthracnose stalk rot | *Colletotrichum graminicola* (teleomorph: *Glomerella graminicola), Glomerella tucumanensis* (anamorph: *Glomerella falcatum)* |
| Aspergillus ear and kernel rot | *Aspergillus flavus* |
| Banded leaf and sheath spot | *Rhizoctonia solani = Rhizoctonia microsclerotia* (teleomorph: *Thanatephorus cucumeris)* |
| Black bundle disease | *Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium* |
| Black kernel rot | *Lasiodiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae* |
| Borde blanco | *Marasmiellus sp.* |
| Brown spot (black spot, stalk rot) | *Physoderma maydis* |
| Cephalosporium kernel rot | *Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium* |
| Charcoal rot | *Macrophomina phaseolina* |
| Corticium ear rot | *Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii* |
| Curvularia leaf spot | *Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans* (teleomorph: *Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia* (teleomorph: *Cochliobolus intermedius), Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus),* |

| | |
|---|---|
| | *Curvularia pallescens* (teleomorph: *Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuberculata* (teleomorph: *Cochliobolus tuberculatus)* |
| Didymella leaf spot | *Didymella exitalis* |
| Diplodia ear rot and stalk rot | *Diplodia frumenti* (teleomorph: *Botryosphaeria festucae)* |
| Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seedling blight | *Diplodia maydis* = *Stenocarpella maydis* |
| Diplodia leaf spot or leaf streak | *Stenocarpella macrospora* = *Diplodia macrospore* |

[0004]

**Table 5 Pests – Rusts**

| Host plant | Common disease name | Rust Species |
|---|---|---|
| Barley | Crown rust | *Puccinia coronate* |
| | Leaf rust | *Puccinia hordei* |
| | Stem rust | *Puccinia graminis* |
| | Stripe (yellow) rust | *Puccinia striiformis* |
| Corn | Common rust | *Puccinia sorghi* |
| | Southern rust | *Puccinia polysora* |
| | Tropical rust | *Physopella pallescens, P. zeae = Angiopsora zeae* |
| Oats | Crown rust | *Puccinia coronata* |
| | Stem Rust | *Puccinia graminis* |
| Rye | Stem rust | *Puccinia gramminis. = P. graminis f. sp. secalis* |
| | Leaf (brown) rust | *Puccinia recondita* (anamorph: *Aecidium clematidis)* |
| Sorghum | Rust | *Puccinia purpurea* |
| Sugarcane | Common Rust | *Puccinia melanocephala.= P. erianthi* |
| | Orange Rust | *Puccinia kuehnii* |
| Wheat | Leaf (brown) rust | *Puccinia triticina.= P. Recondita f. Sp. tritici = P. tritici-duri* |
| | Stem (black) rust | *Puccinia gramminis = P. graminis f. sp. tritici* |
| | Stripe (yellow) rust | *Puccinia striiformis* (anamorph: *P. uredoglumarum)* |
| Apple | American hawthorne rust | *Gymnosporangium globosum* |
| | Cedar apple rust | *Gymnosporangium juniperi-virginianae* |
| | Japanese apple rust | *Gymnosporangium yamadae miyabe ex yamada* |
| | Pacific Coast pear rust | *Gymnosporangium libocedri* |
| | Quince rust | *Gymnosporangium clavipes* |
| Asparagus | Rust | *Puccinia asparagi* |
| Banana | Leaf rust | *Uredo musae, uromyces musae* |
| Bean | Rust | *Uromyces appendiculatus* |
| Beet | Seedling rust. | *Puccinia subnitens* |
| Carrot | Rust | *Aecidium foeniculiuromyces graminis, Uromyces lineolatus subsp. nearcticus* |
| Chickpea | Rust | *Uromyces ciceris-arietini, Uromyces striatus* |
| Coffee | Rust (orange or leaf rust) | *Hemileia vastatrix* |
| | Rust (powdery or grey rust) | *Hemileia coffeicola* |
| Cotton | Cotton rust | *Puccinia schedonnardi* |
| | Southwestern rust | *Puccinia cacabata* |
| | Tropical rust | *Phakopsora gossypii* |

| | | |
|---|---|---|
| Eucalyptus | rust | *Puccini apsidii* |
| Flax | Rust | *Melampsora lini* |
| Crape | Rust | *Physopella ampelopsidis* |
| Lettuce | Rust | *Puccinia dioicae = P. extensicola var. hieraciata* |
| Asparagus | Asparagus rust | *Puccinia asparagi* |
| Onion | Onion rust | *Puccinia allii* |
| Pea | Rust | *Uromyces fabae* |
| peanut | Rust | *Puccinia arachidis* |
| Pear | American hawthorne rust | *Gymnosporangium globosum* |
| | Kern's pear rust | *Gymnosporangium kernianum* |
| | Pacific Coast pear rust | *Gymnosporangium libocedri* |
| | Pear trellis rust | *Gymnosporangium fuscum* |
| | Rocky Mountain pear rust | *Gymnosporangium nelsonii* |
| Poplar | European Poplar rust | *Melampsora larici-populinakle* |
| | American leaf rust | *Melampsora medusae* |
| Potato | Common rust | *Puccinia pittierianap* |
| | Deforming rust | *Aecidium cantensis* |
| Red clover | Rust | *Uromyces trifolii-repentis* |
| Soybean | Rust | *Phakopsora pachyrhizi* |
| Strawberry | Leaf rust | *Phragmidium potentillae = Frommea obtusa* |
| Sunflower | Rust | *Puccinia helianthi, P. xanthii, Uromyces junci* |
| Sweet potato | Red rust | *Coleosporium ipomoeae* |

**Pest pathogenicity genes**

The skilled artisan can readily identify pest genes to target in the present invention. Such a gene could be any pest gene that serves a direct or indirect role in such a pest's deleterious effects on a host plant. By way of example only, such a gene may be one that serves a role in pest growth, development, replication and reproduction, and invasion or infection.

In one embodiment, the host plant does not contain a gene that is more than about 70% homologous to the pest pathogenicity gene.

Optionally, the homology is not more than about 60%.

Optionally, the homology is not more than about 50%.

In one embodiment, the host plant does not contain a gene that contains a 25 nucleotide stretch that is more than about 70% homologous to the pest pathogenicity gene.

In one embodiment, the host plant does not contain a gene that contains a 25 nucleotide stretch that is more than about 60% homologous to the pest pathogenicity gene.

In one embodiment, the host plant does not contain a gene that contains a 25 nucleotide stretch that is more than about 50% homologous to the pest pathogenicity gene.

In one embodiment, the host plant does not contain more than one gene that contains a 25 nucleotide stretch that is more than about 70% homologous to the pest pathogenicity gene.

In one embodiment, the host plant does not contain more than one gene that contains a 25 nucleotide stretch that is more than about 60% homologous to the pest pathogenicity gene.

In one embodiment, the host plant does not contain more than one gene that contains a 25 nucleotide stretch that is more than about 50% homologous to the pest pathogenicity gene.

**Table 6 Pests, Pest pathogenicity genes, and Host Plants**

| Pest or pathogen group | Pest pathogenicity gene | Host Plants |
|---|---|---|
| Fungi | Cutinases | All |
| | Kinases | All |
| | Ribosomal RNAs | All |
| | Adhesins | All |
| | G-proteins | All |
| | Elicitins | All |
| Bacteria | Cutinases | All |
| | Mascerating enzymes | All |
| | Kinases | All |
| | Ribosomal RNAs | All |
| | Adhesins | All |
| | G-proteins | All |
| Insects | Kinases | All |
| | Ribosomal RNAs | All |
| | G-proteins | All |
| | Moulting factors | All |
| | Serine proteases | All |
| | Cysteine proteases | All |
| | Juvenile hormone esterase | All |
| Nematodes | Kinases | All |
| | Ribosomal RNAs | All |
| | G-proteins | All |
| | Cuticle collagen proteins | All |
| | Cathepsin proteases | All |

By way of example, cutinase is a gene useful according to the present invention. When a fungal hypha invades a plant cell and absorbs nutrients, it absorbs the siRNAs from the plant and silences the fungus' essential and constitutive cutinase.

By way of example only, such a gene may be one that serves a role in pest growth, development, replication and reproduction, and invasion or infection. Other non limiting examples include those in Table 6.

**Sense (and antisense) Sequences**

Sense and antisense sequences according to the present invention can be any sequence with homology to a sense and antisense strand (respectively) of pest pathogenicity gene.

The sense and antisense sequences can be on the same DNA strand or on different DNA strands. When the sense and antisense sequences are on the same DNA strand, transcription of these sequences can be driven off the same promoter or off of different promoters (e.g. different copies of the same promoter or different promoter). When the sense and antisense sequences are on different DNA strands, transcription of these sequences is driven off of different promoters.

The sense and antisense sequences can be arranged in DNA as complementary, duplex DNA or the sequences can be in different regions of the DNA (i.e. not forming duplex DNA with each other).

Each of the sense and antisense sequences comprise at least about 19 nucleotides. Optionally, each sequence comprises at least about 50 nucleotides, optionally at least about 100 nucleotides, optionally at least about 150 nucleotides, optionally at least about 250 polynucleotides, optionally at least about 500 nucleotides, optionally at least about 600 polynucleotides.

In one embodiment, the sequences are modified from the pest pathogenicity gene to create or increase homology to the pathogenicity gene of more than one pest.

In another embodiment the sequences are modified from the pest pathogenicity gene to shorten an open reading frame.

In another embodiment the sequences are modified from the pest pathogenicity gene to result in less homology with a plant, animal, or human gene.

In another embodiment, sense and antisense sequences comprise duplicative regions of a pest pathogenicity gene. Selection of such regions is made according to the teachings of the invention herein (e.g. highly conserved regions).

In other embodiments, regions of a pest pathogenicity gene or even the entire coding region of a pest pathogenicity gene may be duplicated to comprise sense and antisense sequences to increase the length of the double stranded region formed by the sense and antisense sequences. While not bound by theory, it is believed that in some embodiments of the present invention, a threshold level of siRNA's must be formed to elicit useful gene silencing in the pest and to confer pest resistance to the plant. Duplication of gene sequences is one useful way of increasing the length of the double stranded region and increasing the number of siRNA.

This (gene duplication) approach is demonstrated in examples herein using the heterologous polynucleotide pVZA300 (SEQ ID 7) comprising the elicitin INF1 of *Phytophthora infestans* (GenBank locus AY766228). This sequence was selected because of its high homology to many other elicitin genes expressed by the genus *Phytophthora*, suggesting that it could silence many other elicitin genes and thereby provide resistance to many species of *Phytophthora*. The sequence selected was 282 nt long, therefore the sequence was repeated (= 564 nt) in both the sense and antisense orientations to approximate the lengths of the sense and antisense portions of pVZA100 (SEQ ID 5), pVZA200 (SEQ ID 6) and pVZA400 (SEQ ID 8) that have been remarkably successful.

The success of this approach was demonstrated by the dramatic effect of pVZA300 in reducing the growth and causing malformation of hyphae of transformed *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora sojae* (Figure 14 D, F) as compared to the effects of transformations with pCAMBIA1201, pVZA100, or pVZA200. The plasmids pVZA200 and pVZA300 are partially identical with both containing a cathepsin gene, but pVZA300 also contains the repeated elicitin gene. Therefore, the deleterious impact of pVZA300 on the fungi must be due to the elecitin gene. This has very positive implications for developing *Phytophthora* resistant plants and application of this approach to depathogenization of *Phytophthora* contaminated soils.

**Transforming Methods**

A wide variety of methods are available for introducing heterologous polynucleotides of the present invention into the target host under conditions that allow for stable maintenance and expression of the polynucleotide. The particular choice of a transformation technology will be determined by its efficiency to transform certain plant species as well as the experience and preference of the person practicing the invention with a particular methodology of choice. It will be apparent to the skilled person that the particular choice of a transformation system to introduce nucleic acid into plant cells is not essential to or a limitation of the invention, nor is the choice of technique for plant regeneration.

While various transformation methods are taught herein as separate methods, the skilled artisan will readily recognize that certain methods can be used in combination to enhance the efficiency of the transformation process. Non-limiting examples of such methods include bombardment with Agrobacterium coated microparticles (EP-A-486234) or microprojectile bombardment to induce wounding followed by co-cultivation with Agrobacterium (EP-A-486233).

Direct delivery can be used to transform plant hosts according to the present invention. By way of non-limiting example, such direct delivery methods include polyethylene glycol treatment, electroporation, liposome mediated DNA uptake (e.g. Freeman et al. Plant Cell Physiol. 29: 1353 (1984)), or the vortexing method (e.g. Kindle, PNAS U.S.A. 87: 1228 (1990d). One form of direct DNA delivery is direct gene transfer into protoplasts from, for example, embryogenic cell suspension cultures (Lazzeri and Lorz (1988) Advances in Cell Culture, Vol. 6, Academic press, p. 291; OziasAkins and Lorz (1984) Trends in Biotechnology 2: 1 19).

**Pollination pathway**

The skilled artisan is aware of certain challenges of genotype-dependant transformation arising from low regeneration potential of cereals. Accordingly, in one embodiment of the present invention, transformation is accomplished by a genotype-independent transformation approach based on the pollination pathway (Ohta Y., 1986). In maize, high efficiency genetic transformation can be achieved by a mixture of pollen and exogenous DNA (Luo Z. X. and Wu R., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:715-719). Maize can be bred by both self-pollination and cross-pollination techniques. Maize has separate male and female flowers on the same plant, located on the tassel and the ear, respectively. Natural pollination occurs in maize when wind blows pollen from the tassels to the silks that protrude from the tops of the ears.

Transformation of rice according to the present invention can also be accomplished via the pollen-tube pathway (Plant Molecular Biology Reporter 6:165-174). The major potential advantages of the pollen-tube pathway approach include: (a) genotype independence; (b) lack of mosaicism; (c) no need for complicated cell and tissue culture techniques.

Transformation of tomato and melon with heterologous polynucleotides according to the present invention can be accomplished into intact plants via pollination pathway (Chesnokov, Yu. V., et al, 1992, USSR Patent No. 1708849; Bulletin of the USSR Patents, No. 4; Chesnokov Yu. V. & Korol A. B. 1993; Genetika USSR, 29:1345-1355). The procedures of genetic transformation based on the pollination-fecundation pathway include: (i) employment of a mixture (paste) of the pollen and transforming DNA; (ii) delivery of the alien DNA into the pollen tube, after pollination; and (iii) microparticle bombardment of microspores or pollen grains.

**Agrobacterium technology**

In one embodiment of the present invention, host plants are transformed using Agrobacterium technology. Agrobacterium-mediated transfer is a widely applicable system

for introducing genes into plant cells because the DNA can be introduced into whole plant tissues, thereby bypassing the need for regeneration of an intact plant from a protoplast. The use of Agrobacterium-mediated plant integrating vectors to introduce DNA into plant cells is well known in the art. See, for example, the methods described by Fraley et al., (1985), Rogers et al., (1987) and U.S. Pat. No. 5,563,055, specifically incorporated herein by reference in its entirety.

Agrobacterium-mediated transformation can efficiently be used with dicotyledonous host plants of the present invention including, by way of non-limiting example, *Arabidopsis*, corn, soybean, cotton, canola, tobacco, tomato, and potato.

Agrobacterium-mediated transformation is also applicable to nearly all monocotyledonous plants of the present invention. By non-limiting example, such monocotyledonous plant technologies are adaptable to rice (Hiei et al., 1997; Zhang et al., 1997; (Ishida et al., 1996); U.S. Pat. No. 5,591,616, specifically incorporated herein by reference in its entirety), wheat (McCormac et al., 1998), and barley (Tingay et al., 1997; McCormac et al., 1998).

Agrobacterium-mediated transformation, according to the present invention, can be accomplished with cultured isolated protoplasts and by transformation of intact cells or tissues.

Agrobacterium-mediated transformation in dicotyledons facilitates the delivery of larger pieces of heterologous nucleic acid as compared with other transformation methods such as particle bombardment, electroporation, polyethylene glycol-mediated transformation methods, and the like. In addition, Agrobacterium-mediated transformation appears to result in relatively few gene rearrangements and more typically results in the integration of low numbers of gene copies into the plant chromosome.

Modern Agrobacterium transformation vectors are capable of replication in *E. coli* as well as Agrobacterium, allowing for convenient manipulations as described (Klee et al., 1985). Moreover, recent technological advances in vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer have improved the arrangement of genes and restriction sites in the vectors to facilitate the construction of vectors capable of expressing various polypeptide coding genes. The vectors described (Rogers et al., 1987) have convenient multi-linker regions flanked by a promoter and a polyadenylation site for direct expression of inserted polypeptide coding genes and are suitable for present purposes. In addition, Agrobacterium containing both armed and disarmed Ti genes can be used for the transformations. In those plant strains where Agrobacterium-mediated transformation is efficient, it is the method of choice because of the facile and defined nature of the gene transfer.

When *Agrobacterium (e.g. A. tumefaciens* and *A. rhizogenes)* is used to transform plant cells according to the present invention, the DNA to be inserted can be cloned into special plasmids, namely either into an intermediate vector or into a binary vector. The intermediate vectors can be integrated into the Ti or Ri plasmid by homologous recombination owing to sequences that are homologous to sequences in the T-DNA. The Ti or Ri plasmid also comprises the vir region necessary for the transfer of the T-DNA. Intermediate vectors cannot replicate themselves in *Agrobacteria.* The intermediate vector can be transferred into *Agrobacterium tumefaciens* by means of a helper plasmid (conjugation).

Binary vectors can replicate themselves both in *E. coli* and in *Agrobacteria.* Such vectors can comprise a selection marker gene and a linker or polylinker which are framed by the right and left T-DNA border regions. They can be transformed directly into *Agrobacteria* (Holsters *et al.* [1978] *Mol. Gen. Genet.* 163:181-187). The *Agrobacterium* used as host cell is to comprise a plasmid carrying a vir region. The vir region is necessary for the transfer of the T-DNA into the plant cell. Additional T-DNA may be contained. The bacterium so transformed is used for the transformation of plant cells. Plant explants can advantageously be cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* or *Agrobacterium rhizogenes* for the transfer of the DNA into the plant cell. Whole plants can then be regenerated from the infected plant material (for example, pieces of leaf, segments of stalk, roots, but also protoplasts or suspension-cultivated cells) in a suitable medium, which may contain antibiotics or biocides for selection. The plants so obtained can then be tested for the presence of the inserted heterologous polynucleotides. No special demands are made of the plasmids in the case of injection and electroporation. It is possible to use ordinary plasmids, such as, for example, pUC derivatives.

Other transformation technology includes whiskers technology. *See* U.S. Pat. Nos. 5,302,523 and 5,464,765, both to Zeneca.

**Microprojectile bombardment**

Optionally, host plant cells are transformed in accordance with the invention by microprojectile bombardment (U.S. Pat. No. 5,550,318; U.S. Pat. No. 5,538,880; U.S. Pat. No. 5,610,042; and U.S. Pat. No. 5,590,390; each of which is specifically incorporated herein by reference in its entirety). In this embodiment, particles are coated with nucleic acids and delivered into cells by a propelling force. Exemplary particles include those comprised of tungsten, platinum, and preferably, gold. It is contemplated that in some instances DNA precipitation onto metal particles would not be necessary for DNA delivery to a recipient cell using microprojectile bombardment. However, it is contemplated that particles may contain

DNA rather than be coated with DNA. Hence, it is proposed that DNA-coated particles may increase the level of DNA delivery via particle bombardment but are not, in and of themselves, necessary.

For the bombardment, cells in suspension are concentrated on filters or solid culture medium. Alternatively, immature embryos or other target cells are arranged on solid culture medium. The cells to be bombarded are positioned at an appropriate distance below the microprojectile stopping plate.

An illustrative embodiment of a transforming method for delivering subject vectors into plant cells is by acceleration is the Biolistics Particle Delivery System (BioRad, Hercules, Calif.), which is used to propel particles coated with DNA or cells through a screen, such as a stainless steel or Nytex screen, onto a filter surface covered with plant cells cultured in suspension. The screen disperses the particles so that they are not delivered to the recipient cells in large aggregates. While not bound by theory, it is believed that a screen intervening between the projectile apparatus and the cells to be bombarded reduces the size of projectiles aggregate and may contribute to a higher frequency of transformation by reducing the damage inflicted on the recipient cells by projectiles that are too large.

For the bombardment, cells in suspension are preferably concentrated on filters or solid culture medium. Alternatively, immature embryos or other target cells may be arranged on solid culture medium. The cells to be bombarded are positioned at an appropriate distance below the microprojectile stopping plate. If desired, one or more screens may be positioned between the acceleration device and the cells to be bombarded. Through the use of techniques set forth herein one may obtain up to 1000 or more foci of cells transiently expressing a marker gene. The number of cells in a focus which express the exogenous gene product 48 hours post-bombardment often range from 1 to 10 and average 1 to 3.

One skilled in the art can optimize the prebombardment culturing conditions and the bombardment parameters to yield the maximum numbers of stable transformants. Both the physical and biological parameters for bombardment are important in this technology. Physical factors are those that involve manipulating the DNA/microprojectile precipitate or those that affect the flight and velocity of either the macro- or microprojectiles. Biological factors include all steps involved in manipulation of cells before and immediately after bombardment, the osmotic adjustment of target cells to help alleviate the trauma associated with bombardment, and also the nature of the transforming DNA, such as linearized DNA or intact supercoiled plasmids. It is believed that pre-bombardment manipulations are especially important for successful transformation of immature embryos.

Accordingly, it is contemplated that the skilled artisan can adjust the bombardment parameters in small scale studies to fully optimize the conditions. One may particularly wish to adjust physical parameters such as gap distance, flight distance, tissue distance, and helium pressure. One may also minimize the trauma reduction factors (TRFs) by modifying conditions which influence the physiological state of the recipient cells and which may therefore influence transformation and integration efficiencies. For example, the osmotic state, tissue hydration and the subculture stage or cell cycle of the recipient cells may be adjusted for optimum transformation. Results from such small scale optimization studies are disclosed herein and the execution of other routine adjustments will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure.

Transformation by microprojectile bombardment is widely applicable, and can be used to transform virtually any plant species. Monocots are optionally transformed by bombardment according to the present invention, for example maize (U.S. Pat. No. 5,590,390), barley (Ritala et al., 1994; Hensgens et al., 1993), wheat (U.S. Pat. No. 5,563,055, specifically incorporated herein by reference in its entirety), rice (Hensgens et al., 1993), oat (Torbet et al., 1995; Torbet et al., 1998), rye (Hensgens et al., 1993), sugarcane (Bower et al., 1992), and sorghum (Casa et al., 1993; Hagio et al., 1991);

Dicots are optionally transformed by bombardment according to the present invention, for example, tobacco (Tomes et al., 1990; Buising and Benbow, 1994), soybean (U.S. Pat. No. 5,322,783, specifically incorporated herein by reference in its entirety), sunflower (Knittel et al. 1994), peanut (Singsit et al., 1997), cotton (McCabe and Martinell, 1993), tomato (Van Eck et al. 1995), and legumes in general (U.S. Pat. No. 5,563,055, specifically incorporated herein by reference in its entirety).

**Electroporation**

In one embodiment, plant cells are transformed using the method of electroporation, *See, for example,* WO 87/06614 to Boyce Thompson Institute; U.S. Pat. Nos. 5,472,869 and 5,384,253, both to Dekalb; and WO 92/09696 and WO 93/21335, both to Plant Genetic Systems.

The method of Krzyzek et al. (U.S. Pat. No. 5,384,253, incorporated herein by reference in its entirety), is well suited for the present invention. In this method, certain cell wall-degrading enzymes, such as pectin-degrading enzymes, are employed to render the target recipient cells more susceptible to transformation by electroporation than untreated cells. Alternatively, recipient cells are made more susceptible to transformation by mechanical wounding.

The method of Tada, Y., et al (Efficient gene introduction to rice by electroporation and analysis of transgenic plants: Use of electroporation buffer lacking chloride ions, Theor Appl Genet, Vol. 80: 475-480, 1990) is, for example, suitable for transforming rice.

In one embodiment, to effect transformation by electroporation, friable tissues, such as a suspension culture of cells or embryogenic callus are used.

Optionally, immature embryos or other organized tissue are transformed directly. In this technique, cell walls are partially degraded by exposing them to pectin-degrading enzymes (pectolyases) or mechanically wounding in a controlled manner.

Non-limiting examples plant cell hosts that can be transformed by electroporation of intact cells according to the present invention are wheat (according to, for example, Zhou et al., 1993), tomato (according to, for example Hou and Lin, 1996), soybean (according to, for example Christou et al., 1987) and tobacco (Lee et al., 1989). See also U.S. Pat. No. 5,384,253; Rhodes et al., 1995; and D'Halluin et al., 1992

In one embodiment, plants are transformed for electroporation of protoplasts (according to, for example, Bates, 1994; Lazzeri, 1995). Non-limiting examples of plant cell hosts that can be transformed by electroporation of protoplasts cells according to the present invention are soybean plants (according to, for example, Dhir and Widholm in PCT Publication No. WO 92/17598, specifically incorporated herein by reference), barley (e.g., Lazerri, 1995), sorghum (e.g., Battraw et al., 1991), (e.g., Bhattacharjee et al., 1997), wheat (e.g., He et al., 1994) and tomato (e.g. Tsukada, 1989).

**Viral Vectors**

Furthermore, viral vectors can also be used to transform plants according to the present invention. For example, monocotyledonous plants can be transformed with a viral vector using the methods described in U.S. Pat. Nos. 5,569,597 to Mycogen Plant Science and Ciba-Giegy, now Novartis.

U.S. Pat. No. 5,589,367 also describes plant transformation with a viral vector.

U.S. Pat. No 5,316,931 describes plant transformation with a viral vector.

A large number of cloning vectors useful for higher plants (including monocots and dicots) according to the present invention comprise a replication system in *E. coli* and a marker that permits selection of the transformed cells. These vectors comprise, for example, pBR322, pUC series, M13mp series, pACYC184, etc., and pCAMBIA 1201. Accordingly, the sequence comprising a heterologous polynucleotide of the present invention can be inserted into the vector at a suitable restriction site. The resulting plasmid is used for transformation into *E. coli*. The *E. coli* cells are cultivated in a suitable nutrient medium, then

harvested and lysed. The plasmid is recovered. Sequence analysis, restriction analysis, electrophoresis, and other biochemical-molecular biological methods are generally carried out as methods of analysis. After each manipulation, the DNA sequence used can be cleaved and joined to the next DNA sequence. Each plasmid sequence can be cloned in the same or other plasmids. Depending on the method of inserting desired genes into the plant, other DNA sequences may be necessary. If, for example, the Ti or Ri plasmid is used for the transformation of the plant cell, then at least the right border, but often the right and the left border of the Ti or Ri plasmid T-DNA, are joined as the flanking region of the genes to be inserted (**Figure 1**).

The use of T-DNA for the transformation of plant cells is described in EP 120 516; Hoekema (1985) In: *The Binary Plant Vector System*, Offset-durkkerij Kanters B.V., Alblasserdam, Chapter 5; Fraley *et al.*, *Crit. Rev. Plant Sci.* 4:1-46; An *et al.* (1985) *EMBO J.* 4:277-287; and many subsequent references widely known and available to those skilled in the art.

**Marker genes**

In order to improve the ability to identify transformants, one may desire to employ one or more marker genes into a heterologous polynucleotide of the present invention.

Marker genes, according to the present invention, include those that encode a selectable marker and those that encode a screenable marker, depending on whether the marker confers a trait that one can "select" for by chemical means, i.e., through the use of a selective agent (e.g., a herbicide, antibiotic, or the like), or whether it is simply a "reporter" trait that one can identify through observation or testing, i.e., by "screening". Of course many examples of suitable marker genes or reporter genes are known to the art and can be employed in the practice of the invention.

Included within the terms selectable or screenable marker genes are also genes that encode a "secretable marker" whose secretion can be detected as a means of identifying or selecting for transformed cells. Examples include markers that encode a secretable antigen that can be identified by antibody interaction, or even secretable enzymes that can be detected by their catalytic activity. Secretable proteins fall into a number of classes, including small, diffusible proteins detectable, e.g., by ELISA, and proteins that are inserted or trapped in the cell wall (e.g., proteins that include a leader sequence such as that found in the expression unit of extensin or tobacco PR-S).

With regard to selectable secretable markers, the use of a gene that encodes a protein that becomes sequestered in the cell wall, and which protein includes a unique epitope is

considered to be particularly advantageous. Such a secreted antigen marker would ideally employ an epitope sequence that would provide low background in plant tissue, a promoter-leader sequence that would impart efficient expression and targeting across the plasma membrane, and would produce protein that is bound in the cell wall and yet accessible to antibodies. A normally secreted wall protein modified to include a unique epitope would satisfy all such requirements.

One example of a protein suitable for modification in this manner is extensin, or hydroxyproline rich glycoprotein (HPRG). The use of the HPRG (Stiefel et al., 1990) is well characterized in terms of molecular biology, expression, and protein structure. However, any one of a variety of extensins and/or glycine-rich wall proteins (Keller et al., 1989) could be modified by the addition of an antigenic site to create a screenable marker.

Elements of the present disclosure are exemplified in detail through the use of particular marker genes. However in light of this disclosure, numerous other possible selectable and/or screenable marker genes will be apparent to those of skill in the art in addition to the one set forth herein below. Therefore, it will be understood that the following discussion is exemplary rather than exhaustive.

**Selectable markers**

Selectable markers for use in connection with the present invention include, but are not limited to, a *neo* gene (Potrykus et al., 1985) that codes for kanamycin resistance and can be selected for using kanamycin, G418, and the like; a *bar* gene that codes for bialaphos resistance; a gene that encodes an altered EPSP synthase protein (Hinchee et al., 1988) thus conferring glyphosate resistance; a nitrilase gene such as *bxn* from *Klebsiella ozaenae* that confers resistance to bromoxynil (Stalker et al., 1988); a mutant acetolactate synthase gene (ALS) or acetohydroxyacid synthase gene (AHAS) that confers resistance to imidazolinone, sulfonylurea, or other ALS-inhibiting chemicals (European Patent Application 154,204); a methotrexate-resistant DHFR gene (Thillet et al., 1988); a dalapon dehalogenase gene that confers resistance to the herbicide dalapon (U.S. Pat. No. 5,780,708); or a mutated anthranilate synthase gene that confers resistance to 5-methyl tryptophan (PCT Publication No. WO 97/26366). Where a mutant EPSP synthase gene is employed, additional benefit may be realized through the incorporation of a suitable chloroplast transit peptide, CTP (U.S. Pat. No. 4,940,835). See also, Lundquist et al., U.S. Pat. No. 5,508,468.

An illustrative embodiment of a selectable marker gene capable of being used in embodiments of the present invention to select transformants are those that encode the enzyme phosphinothricin acetyltransferase, such as the *bar* gene from *Streptomyces hygroscopicus* or

the *pat* gene from *Streptomyces viridochromogenes* (U.S. Pat. No. 5,550,318, which is incorporated by reference herein). The enzyme phosphinothricin acetyl transferase (PAT) inactivates the active ingredient in the herbicide bialaphos, phosphinothricin (PPT). PPT inhibits glutamine synthetase, (Murakami et al., 1986; Twell et al., 1989) causing rapid accumulation of ammonia and cell death.

Suitable selectable marker genes contemplated herein include an aminoglycoside phosphotransferase gene, neomycin phosphotransferase gene, G418 resistance gene, glyphosate resistance gene, hygromycin resistance gene, methotrexate resistance gene, imidazolinones resistance gene, sulfonylureas resistance gene, triazolopyrimidine herbicide resistance gene, ampicillin resistance gene, tetracycline resistance gene, bacterial kanamycin resistance gene, phosphinothricin resistance gene, chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene and luciferase gene, amongst others.

**Screenable Markers**

Screenable markers that may be employed include, but are not limited to, a beta-glucuronidase or *uidA* gene (GUS) that encodes an enzyme for which various chromogenic substrates are known; an R-locus gene, which encodes a product that regulates the production of anthocyanin pigments (red color) in plant tissues (Dellaporta et al., 1988); a beta-lactamase gene (Sutcliffe, 1978), which encodes an enzyme for which various chromogenic substrates are known (e.g., PADAC, a chromogenic cephalosporin); a xyle gene (Zukowsky et al., 1983), which encodes a catechol dioxygenase that can convert chromogenic catechols; an alpha-amylase gene (Ikuta et al., 1990); a tyrosinase gene (Katz et al., 1983), which encodes an enzyme capable of oxidizing tyrosine to DOPA and dopaquinone which in turn condenses to form the easily detectable compound melanin; a beta-galactosidase gene, which encodes an enzyme for which there are chromogenic substrates; a luciferase (lux) gene (Ow et al., 1986), which allows for bioluminescence detection; or even an aequorin gene (Prasher et al., 1985), which may be employed in calcium-sensitive bioluminescence detection, or a green fluorescent protein gene (Niedz et al., 1995).

Genes from the R gene complex are contemplated as useful screenable markers. The R gene complex encodes a protein that acts to regulate the production of anthocyanin pigments in most seed and plant tissue. Maize lines can have one, or as many as four, R alleles that combine to regulate pigmentation in a developmental and tissue specific manner. Thus, an R gene introduced into such cells will cause the expression of a red pigment and, if stably incorporated, can be visually scored as a red sector. If a line carries dominant alleles for genes encoding the enzymatic intermediates in the anthocyanin biosynthetic pathway (C2, A1, A2,

Bz1 and Bz2), but carries a recessive allele at the R locus, transformation of any cell from that line with R will result in red pigment formation. Exemplary lines include Wisconsin 22 that contains the rg-Stadler allele and TR112, a K55 derivative that is r-g, b, P1. Alternatively any genotype of maize can be utilized if the C1 and R alleles are introduced together.

It is further contemplated that R gene regulatory regions may be employed in heterologous polynucleotides of the present invention in order to provide mechanisms for controlling the expression of such heterologous polynucleotides. More diversity of phenotypic expression is known at the R locus than at any other locus (Coe et al., 1988). It is contemplated that regulatory regions obtained from regions 5' to the structural R gene would be valuable in directing the expression of genes, e.g., insect resistance, drought resistance, herbicide tolerance or other protein coding regions. For the purposes of the present invention, it is believed that any of the various R gene family members may be successfully employed (e.g., P, S, Lc, etc.). However, the most preferred will generally be Sn (particularly Sn:bol3). Sn is a dominant member of the R gene complex and is functionally similar to the R and B loci in that Sn controls the tissue specific deposition of anthocyanin pigments in certain seedling and plant cells, therefore, its phenotype is similar to R.

A further screenable marker contemplated for use in the present invention is firefly luciferase, encoded by the *lux* gene. The presence of the *lux* gene in transformed cells may be detected using, for example, X-ray film, scintillation counting, fluorescent spectrophotometry, low-light video cameras, photon counting cameras or multiwell luminometry. It is also envisioned that this system may be developed for populational screening for bioluminescence, such as on tissue culture plates, or even for whole plant screening.

**Marker Gene Strandedness**

According to the present invention, marker genes can be designed by selection of sequence and position within the heteropolynucleotide to result in a positive or negative marker. When a heteropolynucleotide contains sequences of a marker gene but does not contain sufficient complementary sequences to the marker gene, a transcript of the heteropolynucleotide will contain the marker gene in a single stranded region and it can be expressed. Thus expression is correlated with integration of the heteropolynucleotide into the host plant. When a heteropolynucleotide contains sequences of a marker gene and sufficient complementary sequences to the marker gene, a transcript of the heteropolynucleotide will contain the marker gene in a double stranded region and it will be silenced. Thus, expression of such a marker gene will indicate that the heteropolynucleotide is not being silenced in the host plant (i.e. "negative marker"). When a plant cell is transformed with a

heteropolynucleotide comprising both a positive marker and a negative marker gene expresses the positive marker gene but does not express the negative marker gene, this indicates that the plant is transcribing and silencing at least part of the heteropolynucleotide. Thus expression is correlated with integration of the heteropolynucleotide into the host plant (i.e. positive sequences can be selected).

**Choice of marker gene sequence.**

A skilled artisan will now readily recognize how combinations of markers at different positions within a heterologous polynucleotide of the present invention can be effected. Such differences in position effect whether the marker is silenced or not (e.g. a gene within the region that forms a double stranded structure by way of hydrogen bonding is recognized as foreign by the plant's internal defense mechanisms and hydrolyzed into siRNA [i.e. "silenced"]).

For example, in one embodiment, a heterologous polynucleotide of the present invention contains the hypothetical A gene (that is, any marker gene of the present invention) upstream of the double stranded region and a hypothetical B gene within the double stranded region. A non-transformed cell is deficient in A expression ("A-). It is also B- and C-. A transformed cell that functionally inactivates B region (e.g. by gene silencing of the region wherein the B gene lies) is A+ and B-. A transformed cell that fails to inactivate the B region is A+ and B+.

A skilled artisan will now recognize that the presence of antisense sequences of a marker gene, appropriately placed downstream of the sense sequences of the marker gene, will further facilitate gene silencing (e.g. double strand formation) of such marker gene.

It should also now be readily recognized that a marker localized downstream of a double stranded region will also be silenced if no promoter lies between such double stranded region and such marker.

In one embodiment, heterologous polynucleotides of the present invention include those with the structures set forth in Table 7.

## Table 7 Heterologous polynucleotides

Table 7-A Heterologous polynucleotides

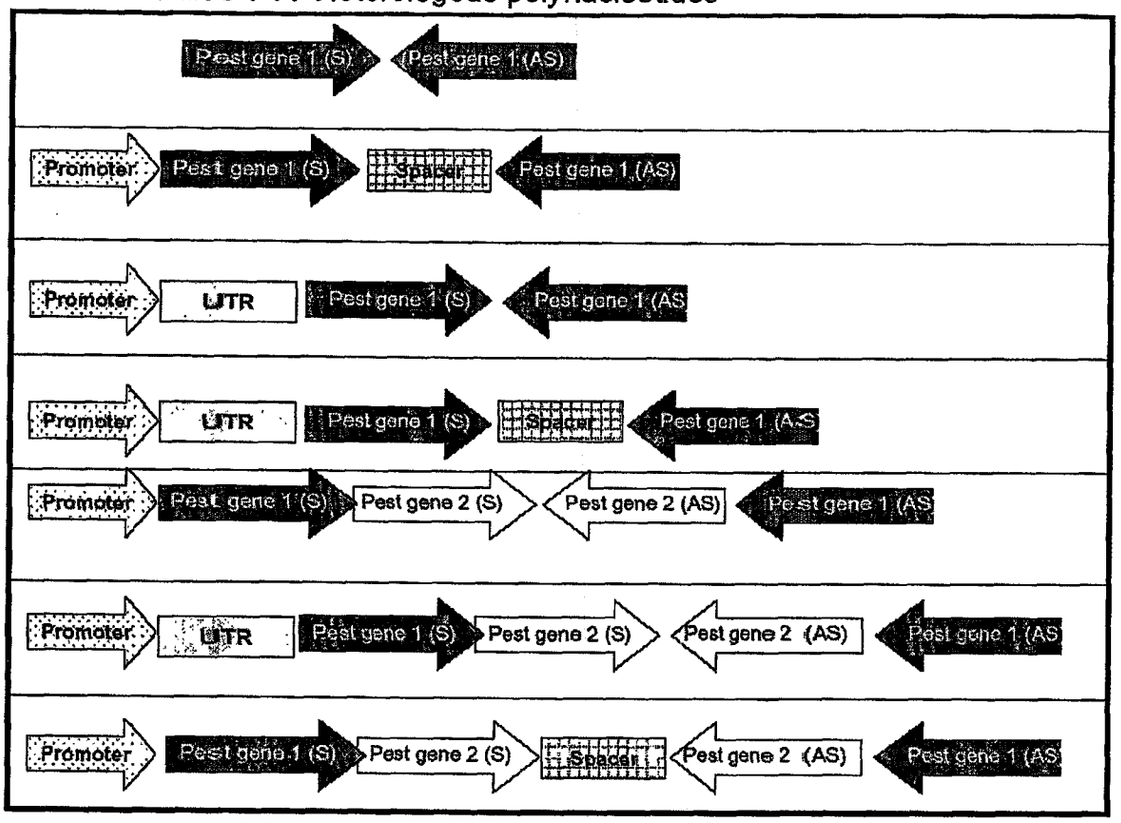



Table 7-B Heterologous polynucleotides

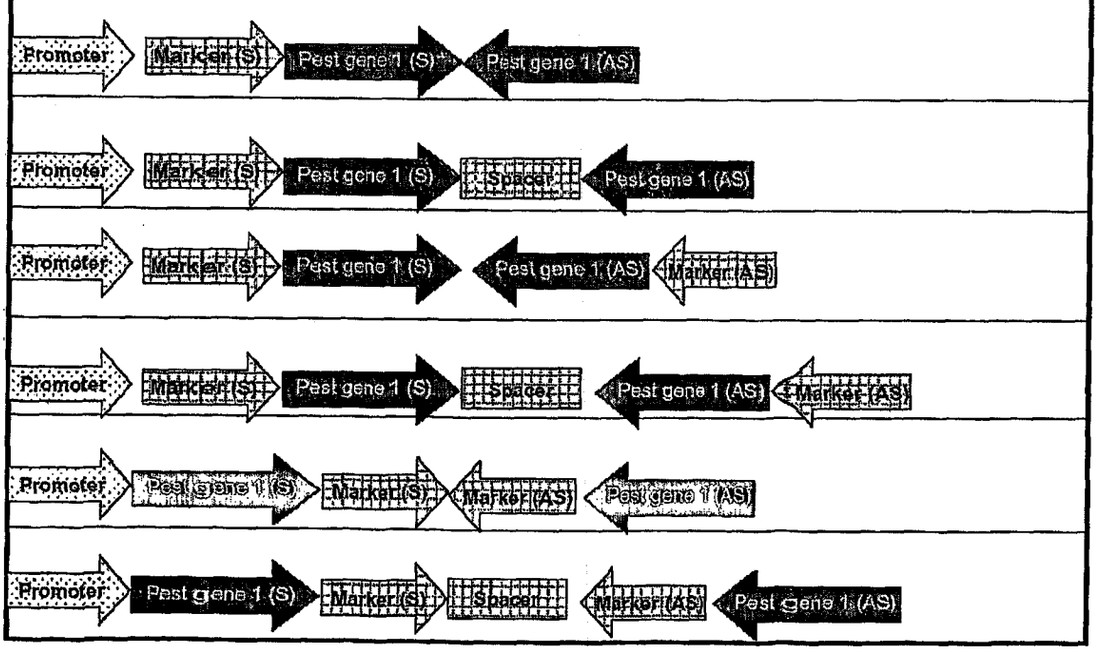


Table 7-C Heterologous polynucleotides

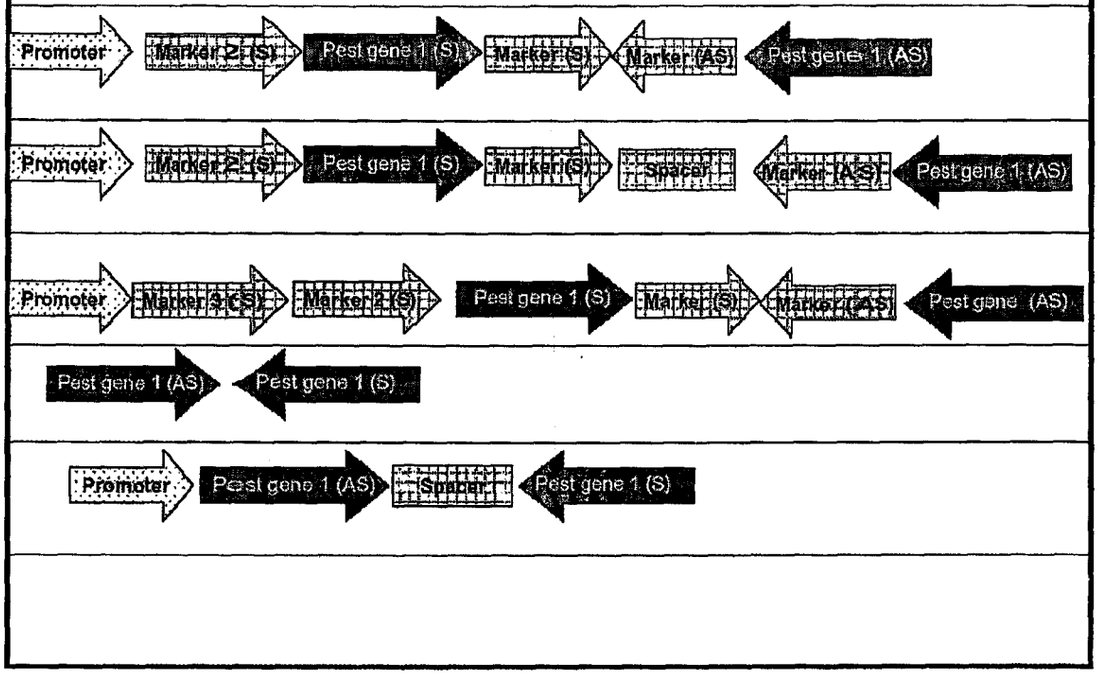



Table 7-D Heterologous polynucleotides

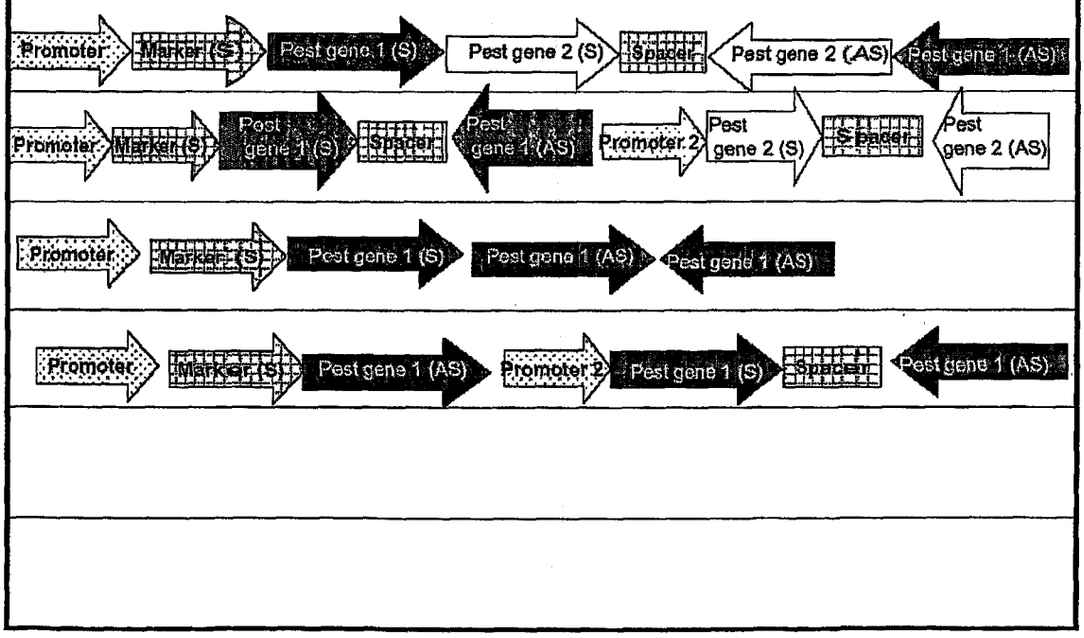


Table 7-C Heterologous polynucleotides

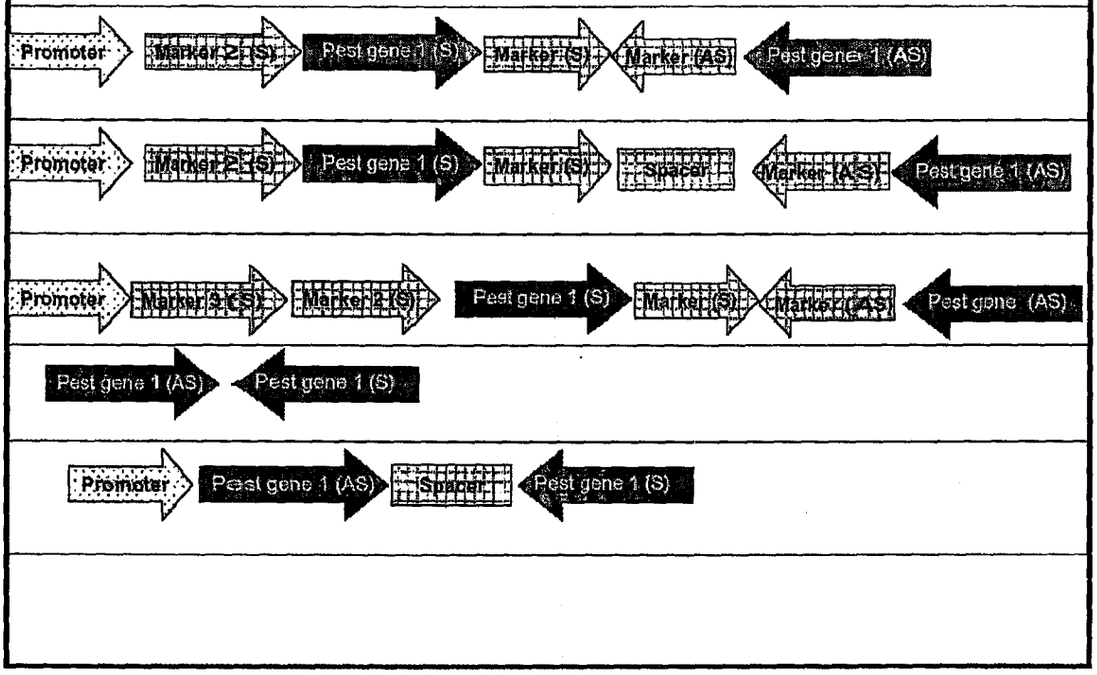



Table 7-D Heterologous polynucleotides

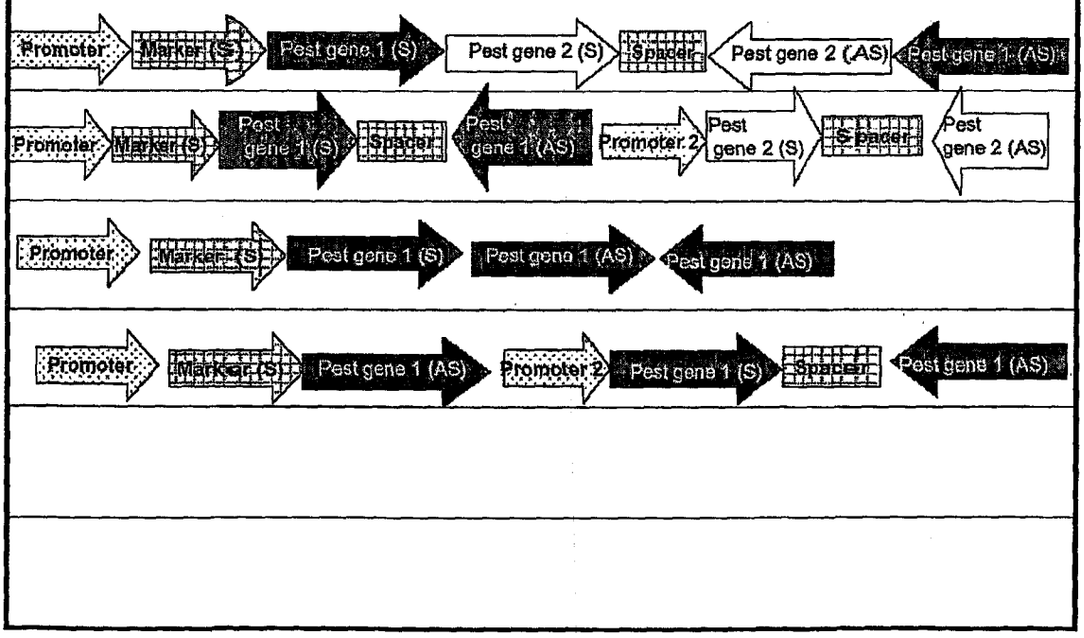
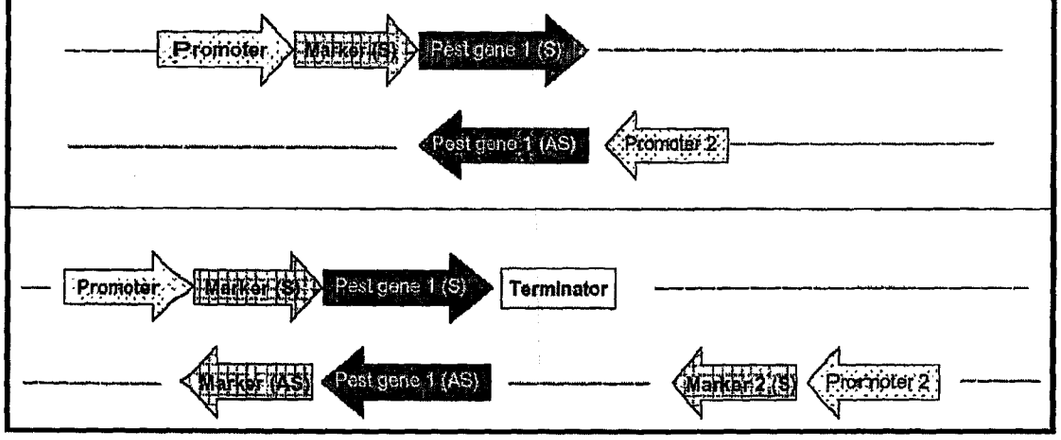


Table 7-E Heterologous polynucleotides




**Promoter and Regulatory Elements**

According to the present invention, a heterologous polynucleotide, or a portion thereof, is capable of being transcribed in a plant. In plants, such transcription requires a promoter that is operably linked to the heterologous polynucleotide. Such a promoter can be endogenous to the plant. By way of example, a heterologous polynucleotide can be inserted adjacent to a constitutive or inducible plant promoter.

The heterologous polypeptide of the present invention can optionally contain a promoter. Such a promoter can be a plant promoter or a non-plant promoter that functions in a plant.

Plant promoters include but are not limited to ribulose-1,6-bisphosphate (RUBP) carboxylase small subunit (ssu), beta-conglycinin promoter, beta-phaseolin promoter, ADH promoter, heat-shock promoters, and tissue specific promoters such as a constitutive promoterwhere it is desirable to directing continuous gene expression in all cell types and at all times (*e.g.*, actin, ubiquitin, CaMV 35S, and the like).

Promoters from a variety of sources can be used efficiently in plant cells to express foreign genes. For example, promoter regulatory elements of bacterial origin, such as the

octopine synthase promoter, the nopaline synthase promoter, the mannopine synthase promoter; promoters of viral origin, such as the cauliflower mosaic virus (35S and 19S), 35T (which is a re-engineered 35S promoter, *see* U.S. Pat. No. 6,166,302, especially Example 7E) and the like may be used.

It may be desirable to use an inducible promoter, which is responsible for expression of genes in response to a specific signal, such as: physical stimulus (heat shock genes), light (RUBP carboxylase), hormone (Em), metabolites, chemical, and stress. Other desirable transcription and translation elements that function in plants may be used. Numerous plant-specific gene transfer vectors are known in the art.

It may be desirable to use a promoter that is active during a certain stage of the plant's development as well as active in plant tissues and organs. Examples of such include but are not limited to pollen-specific, embryo-specific, corn-silk-specific, cotton-fiber-specific, root-specific, seed–endosperm-specific promoters and the like. Tissue specific promoter regulatory elements can be used where it is desirable to promte transcription in tissues such as leaves or seeds (*e.g.*, zein, oleosin, napin, ACP, globulin and the like).

While any promoter that functions in a plant cell (i.e.supports transcription of a heterologous polynucleotide) is useful in the present invention, it can be desirable to select a relatively stronger or weaker promoter. One embodiment of the present invention uses a strong promoter to drive the sense sequence of a pest pathogenicity gene and a weaker promoter to drive the antisense sequence of the pest pathogenicity gene. One skilled in the art can readily determine promoter strength empirically within the embodiments of the present invention. When an embodiment contains two promoters (driving two different transcripts), the relative transcription rate can be determined by quantifying the transcripts (e.g. quantitative PCR).

Examples of promoters that are relatively strong are the figwort mosaic virus promoter and the enhanced CaMV 35S promoter. An example of a promoter that is relatively weaker is the CaMV 35S promoter. One skilled in the art will readily appreciate that "weaker" and "stronger" promoters is a relative term, and they can be empirically identified by, for example, quantitative PCR with the appropriate primers against the transcript that is driven by the promoters.

Other elements such as matrix attachment regions, scaffold attachment regions, introns, enhancers, polyadenylation sequences and the like may be present and thus may improve the transcription efficiency or DNA integration. Such elements may or may not be necessary for DNA function, although they can provide better expression or functioning of the DNA. Such

elements may be included in the DNA as desired to obtain optimal performance of the transformed DNA in the plant. Typical elements include but are not limited to Adh-intron 1, Adh-intron 6, the alfalfa mosaic virus coat protein leader sequence, the maize streak virus coat protein leader sequence, as well as others available to a skilled artisan.

**Terminator**

Heterologous polynucleotides of the present invention can optionally contain a terminator. The term "terminator" refers to a DNA sequence at the end of a transcriptional unit which signals termination of transcription. Eukaryotic terminators are 3'–non-translated DNA sequences containing a polyadenylation signal, which facilitates the addition of poly (A) sequences to the 3'-end of a primary transcript.

Terminators active in cells derived from viruses, yeast, molds, bacteria, insects, birds, mammals and plants are known and described in the literature and useful in the present invention. They may be isolated from bacteria, fungi, viruses, animals and/or plants.

Examples of terminators suitable for use in the present invention include the nopaline synthase (NOS) gene terminator of *Agrobacterium tumefaciens*, the terminator of the Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S gene, the zein gene terminator from *Zea mays*, the Rubisco small subunit (SSU) gene terminator sequences, Subclover stunt virus (SCSV) gene sequence terminators (International Patent Application No. PCT/AU95/00552), and the terminator of the *Flaveria bidents* malic enzyme gene NSEA3 (PCT/AU95/00552).

Those skilled in the art will be aware of additional promoter sequences and terminator sequences suitable for use in performing the invention. Such sequences may readily be used without any undue experimentation.

Embodiments of the present invention are taught herein where it is desirable to have more than one terminator. Examples of such are embodiments are where the sense and antisense sequences are to be contained on separate transcripts (i.e. each having its own 3' and 5' end).

**Plant Regeneration and Propagation**

Following transformation, a plant may be regenerated, e.g., from single cells, callus tissue, or leaf discs, as is standard in the art. Almost any plant can be entirely regenerated from cells, tissues, and organs of the plant. Available techniques are reviewed in Vasil et al. (1984) in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vols. I, II, and III, Laboratory Procedures and Their Applications (Academic press); and Weissbach et al. (1989) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989.

During suspension culture development, small cell aggregates (10-100 cells) are formed, apparently from larger cell clusters, giving the culture a dispersed appearance. Upon plating these cells to solid media, somatic embryo development can be induced, and these embryos can be matured, germinated and grown into fertile seed-bearing plants. Alternatively, callus cells growing on solid culture medium can be induced to form somatic embryos from which fertile seed bearing plants may develop. The characteristics of embryogenicity, regenerability, and plant fertility are gradually lost as a function of time in suspension culture. Cryopreservation of suspension cells arrests development of the culture and prevents loss of these characteristics during the cryopreservation period.

The transformed plants may then be grown, and either pollinated with the same transformed strain or different strains, and the resulting line having expression of the desired phenotypic characteristic identified. Two or more generations may be grown to ensure that expression of the desired phenotypic characteristic is stably maintained and inherited, and then seeds harvested to ensure expression of the desired phenotypic characteristic has been achieved.

In addition to a plant, the present invention provides any clone of such a plant, seed, selfed or hybrid descendants, and any part of any of these, such as cuttings, pollen, or seed. The invention provides any plant propagule, that is any part which may be used in reproduction or propagation, sexual or asexual, including cuttings, seed, and so on. Also encompassed by the invention is a plant which is a sexually or asexually propagated off-spring, clone, or descendant of such a plant; or any part or propagule of said plant, off-spring, clone, or descendant. Plant extracts and derivatives are also provided.

**Gene Stacking**

A heterologous polynucleotide according to the present invention can comprise a plurality of sense sequences and a plurality of antisense sequences (i.e. a "polycistronic heterologous polynucleotide"). Thus, a heterologous polynucleotide can protect a plant against multiple pests.

One skilled in the art will now recognize that, by using gene stacking, a plant can be made resistant to a plurality of pests. The plurality of pests can be from the same phylum or from different phyla. For example, a plant can be made resistant to a plurality of fungal pests. As one non-limiting example of gene stacking according to the present invention, soybeans can be made resistant to brown stem rot (*Phialophora gregata*), stem and root rot (*Phytophthora sojae*), white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum*), sudden death syndrome (*Fusarium solani pisi*), and Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*).

Optionally, a plant can be made resistant to a plurality of insect pests. As one non-limiting example of gene stacking according to the present invention, potatoes can be made resistant to potato leafhopper (*Empoasca filament*), Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*), and green peach aphid (*Myzus persicae*).

Optionally, a plant can be made resistant to a plurality of fungal and non-fungal pests. As one non-limiting example of gene stacking according to the present invention, potatoes can be made resistant to potato golden nematode (*Globodera rostochiensis*), Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*), and potato late blight (Phytophthora infestans).

In one embodiment of the present invention, the heterologous polynucleotide comprises two different sense and two different antisense sequences.

In one embodiment of the present invention, the heterologous polynucleotide comprises at least three different sense and at least three different antisense sequences.

Plant pests often cause the infected plants to become yellow or brown, to be reduced in size, to produce less root exudates and to mature more rapidly. Therefore, controlling a single major pest of a plant may in turn make that plant more susceptible to other pests. If a fungal disease of a plant is controlled, then the healthy plant will remain large and green for a longer period, and therefore be attractive to and susceptible to insects and airborne fungal diseases. The green plant also may produce more root exudates which will attract more nematodes and root infecting fungi. It has been discovered herein that it can be surprisingly advantageous to transform a plant with a heterologous polynucleotide containing sequences homologous to a plurality of pests genes, wherein such genes are from pests of different taxons (e.g. subspecies, species, genera, families, orders, class).

**Depathogenesis**

It has been discovered that when a pest infects a host plant cell transformed according to the present invention, the pest becomes less pathogenic to the transformed host plant cell and non-transformed host plant cells. Moreover, in one embodiment, a pest infects a host plant cell transformed according to the present invention and then the gene silencing molecules derived from the plant by feeding are subsequently transmitted through mating (e.g. by cytoplasmic transmission, conjugation, hyphal anastomosis, etc.) to populations of the pest and produce a less pathogenic pest. In this way, populations of pests can be made non-pathogenic (i.e. less pathogenic) by, for example, a pest that is unable to multiply, and the macroenvironment (e.g. soil, plant foliage, plant debris, buildings) contaminated with a pest can be protected or decontaminated therefrom.

Optionally, progeny of the pest are less pathogenic to the transformed host plant cell and non-transformed host plant cells.

Accordingly, one embodiment of this invention is a mechanism for biological control, and it has great economic value in that it can be used to deplete important fields of pathogenic pest isolates of fungi and reduce the application of pesticides. In this embodiment the transgenic plant transmits the siRNAs to the pest by way of pest feeding behavior, and the pest loses its pathogenicity due to the subsequent silencing of its own pathogenic gene. Moreover, the pest progeny will in turn be nonpathogenic (e.g. by cytoplasmic transmission, mating, conjugation, hyphal anastomosis), thereby effectively cleaning up the local environment of that pest and preventing or significantly reducing its plant destroying behavior.

Depathogenesis, in one embodiment, is accomplished by co-cultivating nonpathogenic (either transformed directly or having obtained siRNAs), pests with pathogenic pests. Such co-cultivation is accomplished, by way of nonlimiting example, by broadcast of the transgenic pest to grow and infest the soil wherein the nonpathogenic pests then mate with like species. Such broadcast can be accomplished for fungi, by way of nonlimiting example, by cultivating transformed fungi on barley or wheat seeds and then distributing such seeds to soil that is in need of being depathogenized or protection from pathogenic pests.

This embodiment is suitable for protecting established valuable plants such as trees (e.g. redwoods, oaks, palms, maples, etc.).

Although the foregoing discussion uses fungal plant pathogens as an example, the strategy for depathogenesis can be adapted to any other plant pests that would transmit the "silenced" trait to their progeny, as will be readily apparent to the skilled artisan.

First, it is possible to "depathogenize" a pest by silencing a pest pathogenicity gene. The pest then could survive in the environment (e.g. soil) and spread the siRNAs throughout the population and no longer attack plants. Second, by silencing major structural genes or essential nutrition genes such as ribosomal RNA or elicitin genes, respectively, it is possible to debilitate or kill a pest thereby eliminating it from crop fields or lowering its presence below economic thresholds.

## Examples

### Example 1. Cloning strategy

The plasmids pVZA100, pVZA200, pVZA300, and pVZA400 are embodiments that were designed for transformation of various plant species, including, but not limited to, tobacco (*Nicotiana tobacum*, cv. Xanthi), soybean (*Glycine max* cv. Williams 82), potato

60
60

(*Solanum tuberosm* cv. Alpha) and corn (*Zea mays* cv. Hi II x B73). pVZA100 contains the full-length cutinase gene from *Phytophthora nicotianae* in both the sense (S) and antisense (AS) orientations, separated by a spacer region containing a portion (817 bp) of the *E. coli* β-glucuronidase gene (GUS) referred to as dGUS. pVZA100 expression in plants is under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and the cucumber mosaic virus (CMV) capsid protein gene 5' untranslated region (5' UTR). The termination signal also is from the CaMV 35S gene. The backbone of the pVZA100 plasmid is the plasmid pCAMBIA1201 (**Figure 1**) (Roberts *et al.*, 2000). Its plant selectable marker is the antibiotic hygromycin. The expression of hygromycin phosphotransferase in pCAMBIA 1201 also is controlled by the CaMV 35S promoter and terminator. The reporter gene in pCAMBIA 1201 is GUS with a catalase intron, also with the CaMV 35S promoter, but with the nopaline synthase (NOS) terminator.

**Example 2. Construction of the intermediary plasmid pVZA1**

Because of its versatility, the gene expression plasmid pUC18cpexp (Slightom, 1991) was selected to contain the gene silencing cassette. This plasmid is pUC18, containing the CaMV 35S promoter, followed by the CMV capsid protein gene 5' UTR and the CaMV 35S gene termination signal. A Bgl II site was engineered into the polylinker between the CMV 5' UTR and the CaMV 35S terminator. To obtain dGUS, the plasmid pCAMBIA1201 (**Figure 1**) was double digested with Nco I and Hinc II. The GUS fragment 821 bp in length, corresponding to nucleotides 9540 to 10361 of pCAMBIA1201, was isolated and purified by agarose gel electrophoresis. That fragment was then digested (blunted) at the 3' Nco I site using mung bean nuclease to reduce it to 817 bp. This blunt-ended dGUS was then re-purified by agarose gel electrophoresis and ligated into the Bgl II site of pUC18cpexp to yield the intermediary plasmid pVZA1 (**Figure 2**).

**Example 3. Construction of the pVZA2, pVZA3, pVZA100, pVZA200, pVZA300 and pVZA400 plasmids**

The full length cutinase gene from *P. nicotianae* was amplified in the antisense orientation by PCR from a cutinase clone in the plasmid pZErO-2.1 (Munoz and Bailey, 1998) using primers VZA 1F (SEQ ID NO: 1) and VZA 2R (SEQ ID NO: 2) containing the Not I and Nco I restriction sites, respectively. It was then purified by agarose gel electrophoresis, and ligated into the Not I and Nco I sites of the plasmid pVZA1. The resulting plasmid, pVZA2, was cloned in *E. coli* and purified. A copy of the cutinase gene in the sense orientation was amplified by PCR from the same cutinase clone in the plasmid pZErO-2.1 using primers VZA 3F and VZA 4R (SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4, respectively)

containing the Apa I and Xho I restriction sites, respectively. It was purified by agarose gel electrophoresis, and ligated into the Apa I and Xho I restriction sites in the plasmid pVZA2 to produce the final intermediary plasmid pVZA3 (**Figure 3**). The portion containing dGUS and separating the cutinase gene in sense and antisense orientation is referred to as the silencing construct. The portion containing the silencing construct plus the regulatory elements for the construct (35S promoter, the 5' UTR and the 35S terminator) is referred to as the silencing cassette (**Figure 3**).

The silencing cassette was excised from plasmid pVZA3 by double restriction digestion with EcoR I and Hind III and purified by agarose gel electrophoresis. The plasmid pCAMBIA1201 was double digested with EcoR I and Hind III, and the silencing cassette was ligated into those sites to produce the final plant transformation plasmid pVZA100. The presence of the entire silencing cassette was confirmed by restriction digestion of pVZA100 with PstI (which releases the whole insert) and by digestions with the various restriction enzymes used in its assembly. The digestion products were separated by agarose gel electrophoresis and compared with known molecular standards. The sequence, 2201 nt, of the silencing construct was confirmed by sequencing of the DNA, and it is SEQ ID NO: 5. The following oligonucleotide pairs were used as PCR primers to detect the presence of the respective genes in pVZA100 and in transgenic plants: cutinase (SEQ ID NOs: 1 and 2, or SEQ ID NOs: 3 and 4); GUS (SEQ ID NOs: 9 and 10) and hygromycin phosphotrasferase (SEQ ID NOs: 11 and 12).

Plant transformation plasmids pVZA200, pVZA300 and pVZA400 were based on the same principle as pVZA100. The silencing construct was an inverted repeat of the selected pest pathogenicity gene in both the sense and antisense orientations, separated by the dGUS fragment. However, the silencing constructs for pVZA200, pVZA300, and pVZA400 were synthesized commercially by GenScript Corporation (Piscataway, NJ) with ApaI and Not I restriction sites at the 5' and 3' ends respectively, and cloned in the pUC57 vector.

The silencing construct of pVZA200 contained nucleotides 221 to 820 of the cathepsin B gene (GenBank locus AY702822) of the aphid *Myzus persicae*. This aphid is a major pest and the most efficient vector of many plant viruses. Cathepsin B is a cysteine protease, a digestive enzyme required for the survival and development of *Myzus persicae*. The 2031 nt sequence of the silencing construct for pVZA200 is shown as SEQ ID NO: 6.

The regulatory elements were then added to the pVZA200 silencing construct to yield the pVZA200 silencing cassette. For this, the entire pVZA100 silencing cassette was excised from pVZA100 by digestion with EcoR I and Hind III and purified by agarose gel

electrophoresis. It was cloned into a similarly digested pUC19. This plasmid was then digested with ApaI and Not I. The pUC19 portion containing the regulatory elements from pVZA100 was purified and ligated to the pVZA200 silencing construct released from pUC57 by digestion with ApaI and Not I. The pVZA200 silencing cassette, now flanked by the regulatory elements from pVZA100, was increased in pUC19. The entire pVZA200 silencing cassette was excised from pUC19 by digestion with EcoR I and Hind III and then ligated into the EcoR I and Hind III sites of pCAMBIA1201 to complete the pVZA200 plant transformation plasmid. As with pVZA100, the presence of the entire silencing cassette was confirmed by restriction digestion of pVZA200 with PstI and by digestions with the various restriction enzymes used in its assembly. The digestion products were separated by agarose gel electrophoresis and compared with known molecular standards.

The following oligonucleotide pairs were used as PCR primers to detect the presence of the respective genes in pVZA200 and in transgenic plants: cathepsin (SEQ ID NOs: 38 and 39); GUS (SEQ ID NOs: 9 and 10) and hygromycin phosphotrasferase (SEQ ID NOs: 11 and 12).

The plant transformation plasmids pVZA300 and pVZA400 were planned similarly and synthesized. The silencing construct of pVZA300 was a double gene construct, containing gene sequences from two different plant pests. It was designed to contain the same cathepsin B gene inverted repeat around the dGUS fragment as the silencing construct of pVZA200. But in addition, at each end it contained the partial coding sequence for the elicitin INF1 of *Phytophthora infestans* (GenBank locus AY766228). This elicitin gene is required by *Phytophthora infestans* for pathogenicity and as a sterol receptor because *Phytophthora spp.* do not synthesize the sterols essential for their growth and development. The elicitin sequence was 282 nt long. Therefore, to obtain a sequence approaching 600 nt, the sequence was repeated to obtain 564 nt.

An ApaI restriction site was included at the 5' end of the elicitin sense sequence, and a NotI restriction site was included at the 3' end of the elicitin antisense sequence. The elicitin sense sequence was added to the 5'end of the pVZA200 sequence, and the elicitin antisense sequence was added to the 5'end of the pVZA200 sequence to complete the silencing construct of pVZA300. It is 3159 nt long and composed of the elicitin gene and cathepsin gene both in the sense orientation, followed by dGUS, followed by the cathepsin gene and elicitin gene, respectively, both in the antisense orientation.

The sequence of the silencing construct for pVZA300 is shown as SEQ ID NO: 7. This sequence was synthesized by GenScript Corporation and cloned in the pUC57 vector. The regulatory elements were then added as described for pVZA200 to complete the silencing

cassette for pVZA300, and it was cloned into the EcoR I and Hind III sites of pCAMBIA1201. As previously, the presence of the entire silencing cassette was confirmed by restriction digestion of pVZA300 with PstI and by digestions with the various restriction enzymes used in its assembly. The digestion products were separated by agarose gel electrophoresis and compared with known molecular standards. The following oligonucleotide pairs were used as PCR primers to detect the presence of the respective genes in pVZA300 and in transgenic plants: elicitin and cathepsin overlap (SEQ ID NOs: 40 and 39) cathepsin (SEQ ID NOs: 38 and 39); GUS (SEQ ID NOs: 9 and 10) and hygromycin phosphotrasferase (SEQ ID NOs: 11 and 12).

The silencing construct of the plant transformation plasmid pVZA400 contained nt 1-600 of the ribosomal RNA genes (rDNA) of *Phytophthora infestans* (GenBank locus AJ854293) in the sense and antisense orientations, respectively, separated by dGUS. An ApaI and NotI restriction site were included on the 5' and 3' ends, respectively. The sequence of the silencing construct (2031 nt) for pVZA400 is shown as SEQ ID NO: 8. It was synthesized by GenScript Corporation and cloned in the pUC57 vector. The regulatory elements were then added as described for pVZA200 to complete the silencing cassette for pVZA400, and it was cloned into the EcoR I and Hind III sites of pCAMBIA1201. As previously, the presence of the entire silencing cassette was confirmed by restriction digestion of pVZA400 with PstI and by digestions with the various restriction enzymes used in its assembly. The digestion products were separated by agarose gel electrophoresis and compared with known molecular standards.

The following oligonucleotide pairs were used as PCR primers to detect the presence of the respective genes in pVZA400 and in transgenic plants: ribosomal DNA (SEQ ID NOs: 41 and 42); GUS (SEQ ID NOs: 9 and 10) and hygromycin phosphotrasferase (SEQ ID NOs: 11 and 12).

**Example 4. Transformation methods**

Plant cells (including tobacco, soybean, potato and corn) were transformed with transformation plasmids pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300, and pVZA400 using biolistics or with pVZA100 using strain PGV 2260 of *Agrobacterium tumefaciens.* Fungal cultures were transformed only by biolistics with transformation plasmids pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300, and pVZA400.

Preparation of tungsten or gold microprojectiles for bombardment with the helium-driven biolistic device was according to the protocol of Shark *et al.* 1991. The microprojectiles were coated with either pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300, pVZA400, or with no DNA. For plant tissue and fungal culture transformation, the Dupont

PDS-1000 apparatus was used under vacuum (23 mm Hg) and at 1200 PSI with tissues at 8 and 12 cm from the stopping plate. For seedling and plantlet transformation, a hand held homemade particle gun was used at 200 PSI, and held as close as possible to the developing meristem.

The transformations with *Agrobacterium tumefaciens* were performed essentially as described by Rogers et al. (1987). Although biolistics and *Agrobacterium tumefaciens* transformation are used to exemplify this portion of the subject invention, any method of introducing heterologous DNA into target cells for purposes of transformation that is known in the art could be used, as would readily be appreciated by the ordinarily skilled artisan, and as would be optimized depending on the target species.

**Example 5. Tobacco transformation with pVZA100 and regeneration**

Organogenic callus cultures of *Nicotiana tabacum* cv Xanthi were maintained in shake cultures in the laboratory and transferred monthly to fresh MS medium (Murashige and Skoog, 1962). Calli were removed from flasks aseptically, filtered free of liquid and spread on sterile filter paper in a sterile plastic Petri dish. They were bombarded with pVZA100 according to the methods described above, and the filter paper was transferred to phytohormone-free MS medium overnight. The following day the filter paper was transferred to MS medium containing 1 mg/l 6-benzyladenine, 0.1 mg/l napthaline acetic acid, 1 mg/l thiamine-HCl, 100 mg/l inositol, 30 g/l sucrose, 6 g/l phytagar and 30ug/ml hygromycin for selection of the transgenic cells. For regeneration, the expanding calli were transferred to fresh MS medium every 2 weeks. Emerging shoots were then transferred to MS medium without phytohormones to form roots. Rooted plantlets were transferred to soil or tested directly for resistance to *P. nicotianae*. Plants were grown to maturity in soil and seed collected for subsequent analysis.

**Example 6. Fungal transformation and selection protocols**

Five mm mycelial discs of *Phytophthora nicotianae, P. sojae* and *P. infestans* were bombarded according to the methods and with the constructs described in Examples 3 and 5. Bombarded cultures were placed on plates of V-8 agar and incubated at 27C overnight. The following day they were transferred to V-8 agar plates containing 400 ug/ml hygromycin and incubated at 27C for 3-4 days. Discs (5 mm) were cut from the new growth and transferred to Petri dishes containing 15 ml of V-8 broth and incubated at 27C for 2 days. The mycelial mats were washed with sterile water, pressed dry and incubated for 2 days with 10 ml of soil extract to induce sporangia formation. To induce zoospore release, the mats were placed in sterile demineralized water and chilled at 4C for 30-60 min. Zoospores were collected by centrifugation for 5 min. at 5,000 g and 4C. For selection, the zoospore concentration was

adjusted to approximately 1,000/ml and plated on V-8 agar containing 400 ug/ml hygromycin and X-gluc (Jefferson *et al.*, 1986) and incubated for several days at 27C.

Those isolates stably transformed with the GUS gene in pCAMBIA1201 appeared on the X-gluc agar as small blue colonies originating from single zoospores. They were transferred to individual plates of V-8 agar containing 400 ug/ml hygromycin, and the cultures consistently stained blue, positive for GUS, after many transfers. Those isolates transformed with the pVZA100, pVZA200, pVZA300, and pVZA400 silencing plasmids also initially appeared as small blue colonies originating from single zoospores. They were transferred to plates of V-8 agar containing 400 ug/ml hygromycin and X-gluc. After 2-3 transfers on this medium, those colonies which survived became white, indicating that the GUS gene had been silenced. All cultures were maintained at 27C and transferred monthly to fresh medium.

**Example 7. Transformation of corn, soybeans and potato**

Corn was transformed by bombarding Type II callus from Hi II germplasm with gold particles coated with two plasmids, pVZA100 and pBAR184 (Frame et al., 2000). The pBAR184 was included so that the co-transformants could be selected and regenerated on media containing the herbicide bialaphos rather than hygromycin. Calli were grown and selected on N6-based media containing 2 mg/l each of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and bialaphos. For regeneration and rooting, embryos were transferred to MS media containing 2 mg/l of bialaphos, and no phytohormones. Rooted plantlets were assayed by PCR.

Soybean was transformed both by *Agrobacterium tumefaciens* and biolistics. Mature embryos were excised aseptically from hydrated seeds of Williams soybean. The embryos were then soaked for 15 min. in a few milliters of a culture of *Agrobacterium tumefaciens* that had been grown on a shaker overnight at 28C and contained either pCAMBIA1201 or pVZA100. The treated embryos were placed on MS medium containing 15 mg/L of hygromycin and phytohormones (BAP and NAA) and then on MS medium free of phytohormones for rooting. Embryo-like structures formed and germinated, and leaves were produced (Figure 6), but no plants were regenerated and rooted, despite testing of many media. Biolistic transformation of soybean was performed using the hand held homemade particle gun. Seedlings 8-10 days old and 6-10 cm tall were bombarded with gold particles coated with either pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300 or pVZA400 or with no DNA. The plants were grown in the greenhouse and assayed by PCR. Mature seed was collected and tested for resistance to P. *sojae*.

Potato was transformed both by *Agrobacterium tumefaciens* and biolistics. Russett Burbank and Alpha potatoes were transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. Tubers were

surface disinfested, and the potato "eyes" were excised and plated on solid MS medium without phytohormones. The eyes germinated, and plantlets were produced by cutting a node section containing one leaf and placing the stem in fresh MS medium. Rooted plantlets 5-7 cm tall were produced in 10-15 days. The leaves were removed from the plantlets, and the stems were cut into pieces 1 cm long. The pieces were then soaked as above for 15 min. in a few milliters of a culture of *Agrobacterium tumefaciens* that had been grown on a shaker overnight at 28C and contained either pCAMBIA1201 or pVZA100. The pieces were blotted on sterile filter paper and the tissue culture procedure of Cearley and Bolyard (1997) was followed. Bulbous tuber-like and root-like structures were produced (Figure 8), but no plants were regenerated and rooted, despite testing of many media. For biolistic transformation, potato plantlets 3-5 cm tall were transplanted to soil. After 2-3 days they were bombarded using the hand held homemade particle gun and gold particles coated with either pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300 or pVZA400 or with no DNA. The plants were grown in the greenhouse and assayed by PCR and for their reactions to aphids and *P. infestans*.

**Example 8. DNA and RNA extraction from plant and fungal tissues and PCR and RT/PCR protocols**

Total DNA was extracted from tobacco leaf tissue and mycelium of *Phytophthora nicotianae* by the method of Dellaporta et al., 1983. Usually a 100 mg sample of frozen tissue was ground to a fine powder in a microfuge tube containing liquid nitrogen, and then homogenized in 500 ul of extraction buffer with a motor-driven stainless steel pestle.

Total RNA for RT/PCR reactions was extracted from leaf tissue and fungal mycelium by the TRIzol method of Invitrogen. Usually 100 mg of tissue was frozen in liquid nitrogen in a 1.8 ml microfuge tube. It was ground to fine powder and then homogenized in 1.0 ml of TRIzol with a motor-driven pestle. The mixture was allowed to incubate for 5 min. at room temperature. Then 200 ul of chloroform were added and mixed by vortexing. The suspension was incubated 5 min. at room temperature. The tubes were centrifuged at 14,000 rpm for 15 min. at 4 C. The aqueous phase was transferred to a clean tube, 500 ul of isopropanol were added and the samples mixed and incubated 10 min. at room temperature. The tubes were centrifuged again for 10 min. at 4 C, and the supernatant was discarded. The pellet was rinsed once with 250 ul of 75% ethanol by vortexing and centrifuging 5min. at 4 C. The RNA pellet was air dried briefly, dissolved in 20 ul of RNase-free water and stored at -70 C until used.

A similar method was used for large preparations of total RNA for siRNA detection. Usually 1 gram of frozen leaf or fungal mycelium was ground to fine powder in liquid nitrogen and homogenized with 15 ml TRIzol reagent. Then 3 ml of chloroform were added

and incubated as above. The supernatant was recovered by centrifugation and the RNA precipitated with 1/2 volume of isopropanol. The pellet was washed with 75% ethanol, air dried and resuspended in 80 ul of RNase-free water.

The PCR reactions for both plant and fungal tissues were performed essentially as described by Munoz and Bailey, 1998, except the reaction volumes totaled 50ul. The reactions contained 1X PCR buffer (10X solution: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.0, and 1% Triton X-100), 2.5 mM $MgCl_2$, 200 μM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 2.5 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen or Promega), 100 pmol of the appropriate forward and reverse oligonucleotide primer (see SEQ ID NOs:), 1-10 ul of template and sufficient deionized water to equal 50ul. DNA preparations used as templates were usually diluted to 50 ng per microliter, and 1 microliter was used as the template.

The PCR reaction conditions were standardized except for the annealing temperature, which was varied depending on the Tm of the oligonucleotide primers for the gene being amplified. The standardized conditions were 94C for 2min. for melting, followed by 40 cycles of 1 min. at 94C, 1 min. at the annealing temperature, and 2 min. at 72C for elongation. After 40 cycles there was 10 min. elongation at 72C, and the reactions were held at 4C until assayed.

The RT/PCR reactions were carried out in 3 separate steps, DNase treatment, reverse transcription and then PCR, as recommended by Invitrogen. The DNAse treatment was performed to eliminate any DNA carried over in the RNA purification to ensure that only messenger RNA was being transcribed, and not the genomic DNA. The DNase mix contained per reaction: 3 ug of RNA, 1 ul 10X DNAse I buffer, 2 ul DNAse I, 0.5 ul RNase OUT and water (RNase-free) to 10ul final volume. This was incubated at 26C for 30 min. Then 6.5 ul of 25mM EDTA were added per tube and incubated for 15 min. at 65C.

For the reverse transcriptase (RT) reactions a Mix I and Mix II were prepared. Mix I contained per reaction: 1 ul dNTPs, 4 ul 5X RT buffer, and 2 ul dithiothreitol. Mix II contained per reaction: 0.5 ul RNase OUT, 1 ul reverse transcriptase and 1 ul water. The appropriate oligonucleotide primers (1 ul each or water) were placed in the appropriate tubes and Mix I and II added appropriately. Mix I was placed in every tube, Mix II in the odd numbered tubes and 2.5 ul water in the even numbered tubes; then 10 ul of DNase treated RNA was added to each tube. The RT reactions were incubated at 42C for 60 min, and then at 70C for 15 min.

**Example 9. Detection of siRNAs in plant and fungal tissues**

The procedure was essentially as described by Hutvagner *et al.*, 2000. Total RNA was extracted from tobacco leaves or fungal mycelium as above. It was quantitated in a

spectrophotometer at 260nm and 80 ug were fractionated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis on 15% gels for 2.5 hrs at 0.025 Amp. The gels were stained with ethidium bromide, photographed, and the RNA transferred to hybond N+ (Amersham) for 1 hr. at 10 volts at 4 C. Hybridization was performed as described by Sambrook *et al.* (1989) for Northern blotting.

The probe was transcribed from a 500 bp PCR product of the cutinase gene and labeled with $^{32}P$ by random priming. Membranes were prehybridized 1 hr at 50 C with HYBAID buffer solution from Amersham and hybridized for at least 16 hrs at 50 C. Washes were performed twice with 5X SSC at room temperature. The hybridization signals were detected by phosphorimaging, using a Storm 860 phosphorimager scanner from Molecular Dynamics.

**Example 10. GUS staining of plant and fungal tissues**

Preparation of the X-GLUC substrate: For 200 ml, set up a beaker with 150 ml distilled water and add the following components: Sodium phosphate buffer pH 7.0 (1 M), 20 ml, EDTA pH 8.0 (500 mM), 4ml, Potassium ferrocyanide K4Fe(CN)6.3H2O, 0.042g, Triton X-100 0.2 ml. Stir for 10 min. Adjust pH 7.0 with NaOH. Dissolve 100 mg of X-GLUC in 2 ml DMSO or dimethyl-formamide. Add the X-GLUC in DMSO to the beaker. Filter sterilize the solution, dispense in 10 ml aliquots, and store at -20C. For incorporation into growth media, add 100 mg of X-GLUC powder dissolved in DMSO to 250 ml V8 agar cooled and ready to dispense for fungal isolates or to MS media for plant materials.

Staining procedure: Add enough X-GLUC solution to cover the small explant of plant tissue and incubate at 37C for 3-24 hours. For fungal isolates or plant materials in X-gluc agar plates, incubate at 24-27 C for 3-24 hours.

This procedure is essentially as described by Jefferson, et al., 1986.

**Example 11. Plant inoculation tests with fungi**

Three methods were tested to inoculate tobacco with *P. nicotianae.* All gave satisfactory results, but the toothpick method was more rigorous and more dependable.

1. Toothpick method: This method was provided by Dr. A. Csinos (personal communication). Round wooden toothpicks were broken in half and autoclaved in V-8 broth. The sterile toothpicks were laid flat in plates of V-8 agar, and 6-8 mycelial discs (5 mm in diameter) of *P. nicotianae* were spaced equidistant on the plate. The plates were incubated at 27C for at least 2 weeks, when chlamydospores become obvious by microscopic examination. Plant inoculation is accomplished by standing 1 or 2 toothpicks in the soil next to the crown of the plant. The plants were covered with a plastic tent to maintain relative humidity at 100% and incubated at 27C. Symptoms were usually apparent after 2-4 days, and susceptible plants

were usually dead after 5-8 days. The reactions of resistant transgenic plants vary from being symptomless to producing restricted stem lesions 1-4 cm long, which do not interfere with plant growth and subsequent flower and seed development.

2. The mycelial soak method: Mycelia of *P. nicotianae* were grown overnight at 27C in V-8 broth. Transgenic seedlings or plants in soil were washed free of the medium and placed in 100 ml of sterile deionized water. Mycelial mats were shredded with forceps and added to the water. The plants were covered with a plastic tent to maintain relative humidity at 100% and incubated at 27C. Symptoms were usually apparent after 2-4 days, and susceptible plants were usually dead after 5-8 days. The roots and crown of the susceptible plants were completely macerated (Figure 11A). The roots of the resistant transgenic plants appear to be "burned" at the tips (Figure 11B), or there were defined lesions at the crown, but this does not interfere with plant growth and subsequent flower and seed development after the plants were potted in soil.

3. Zoospore inoculation: Abundant sporangia were produced by placing strips of surface-sterilized tobacco leaves in growing cultures of *P. nicotianae* at 27C in V-8 broth overnight. Millions of zoospores were released, by placing the mats in sterile demineralized water and chilled at 4C for 30-60 min. Zoospores were collected by centrifugation for 5 min. at 5,000 g and 4C.

Soybean plants were inoculated with *P. sojae* by two different methods. Seedlings were inoculated by cutting a 3 mm cylinder from an actively growing culture on V8 agar with a cork borer and placing the cylinder in the axil of one hypocotyl. The inoculum was held in place by Parafilm, and the plants enclosed in a plastic bag to give 100% humidity. Leaves of soybean plants were inoculated with *P. sojae* by placing a leaf in a Petri dish with10 ml of sterile water and adding 1 or 2 plugs of inoculum as above.

Potato leaves were inoculated with *P. infestans* by placing a leaf in a Petri dish with10 ml of sterile water and adding 1 or 2 plugs of inoculum as above, or by placing 10 ul of a zoospore suspension per leaflet.

In all inoculation tests, the plant or leaf reactions were read and recorded daily until the inoculated plants or leaves stopped dying or showed no evidence of infection.

**Example 12. Molecular characterization of P. nicotianae resistant tobacco plants**

DNA and RNA were extracted from T0 and T2 generation transformed plants of Example 27. Polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription/PCR (RT/PCR) tests were performed on the DNA and RNA samples, respectively. The PCR reactions were performed to determine the presence of the transgenes in the plants. The RT/PCR reactions

were performed to determine if the transgenes were being expressed or had been silenced. The results were the same for both the T0 and T2 generations, and are summarized in Table 8.

**Table 8. Gene Detection and Expression in Transgenic and Wild Type Tobacco Plants**

| | Hygromycin phosphotransferase | | GUS | |
|---|---|---|---|---|
| **Tissue Assayed** | **PCR** | **RT-PCR** | **PCR** | **RT-PCR** |
| Tobacco wild type | - | - | - | - |
| Tobacco + pCAMBIA1201 | + | + | + | + |
| pVZA100 Transgenic line 4 | + | + | + | - |
| pVZA100 Transgenic line 23 | + | + | + | - |
| pVZA100 Transgenic line 26 | + | + | + | - |
| pVZA100 Transgenic line 27 | + | + | + | - |
| pVZA100 plasmid DNA | + | na | + | na |
| | **Cutinase** | | **16S Ribosomal RNA** | |
| **Tissue Assayed** | **PCR** | **RT-PCR** | **PCR** | **RT-PCR** |
| Tobacco wild type | - | - | + | + |
| Tobacco + pCAMBIA1201 | - | - | + | + |
| pVZA100 Transgenic line 4 | + | - | + | + |
| pVZA100 Transgenic line 23 | + | - | + | + |
| pVZA100 Transgenic line 26 | + | - | + | + |
| pVZA100 Transgenic line 27 | + | - | + | + |
| pVZA100 plasmid DNA | + | na | - | na |

+ = Positive (gel band) - = Negative (no gel band) na = Not applicable

In the upper panel of **Table 8**, the data in the first column demonstrate that the hygromycin resistance gene (hygromycin phosphotransferase) was not present in the wild type tobacco plants, but it was present in all the plants transformed with either the pCAMBIA 1201 plasmid alone or with pVZA100. The data in the second column demonstrate that the hygromycin phosphotransferase gene was expressed in all plants in which it was present. The data in the third column demonstrate that the GUS gene was not present in the wild type tobacco plants, but it was present in all the plants transformed with either the pCAMBIA 1201 plasmid alone or with pVZA100. The data in the fourth column demonstrate that the GUS gene was expressed only in the pCAMBIA 1201 transformed plants, where no GUS silencing construct was present. However, GUS was silenced in all transgenic plants containing the pVZA100 silencing construct.

In the lower panel of **Table 8**, the data in the first column demonstrate that the fungal cutinase gene was not present in the wild type tobacco plants, nor in those plants transformed

with the pCAMBIA 1201 plasmid alone. However, it was present in all the plants transformed with pVZA100. The data in the second column demonstrate that the fungal cutinase gene was not expressed in either the wild type plants or in those plants transformed with either the pCAMBIA 1201 plasmid alone or with pVZA100. The data in the third column demonstrate that the 16S ribosomal RNA gene was present in the wild type and all of the transgenic tobacco plants, but not in the silencing construct. The data in the fourth column demonstrate that the 16S ribosomal RNA gene was expressed in all of the tobacco plants, whether wild type or transgenic.

When the wild type tobacco plants or those transformed with pCAMBIA1201 were inoculated with *P. nicotianae*, they were always susceptible, whereas those transformed with pVZA100, such as Transgenic lines 4, 23, 26 and 27 were resistant (Figure 11 A and B, respectively).

**Example 13. Fungal transformation and characterization**

Different cultures of either *P. nicotianae or P.sojae* are bombarded with either pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300, or pVZA400 as above, and single zoospore cultures are produced from the viable cultures.

Those *P. nicotianae* cultures bombarded with pCAMBIA1201 and pVZA100 were tested for pathogenicity on the normally susceptible wild type Xanthi tobacco. Those cultures transformed with pCAMBIA1201 remained pathogenic, whereas those cultures transformed with pVZA100 were nonpathogenic. Wild type and transgenic cultures of *P. nicotianae* were grown in liquid V8 medium and DNA and RNA were extracted as described above. Those samples were analyzed by PCR and RT/PCR as above. The results are summarized in Table 9.

**Table 9. Gene Detection and Expression in Transgenic and Wild Type *Phytophthora nicotianae***

| | Hygromycin phosphotransferase | | GUS | |
|---|---|---|---|---|
| **Tissue Assayed** | **PCR** | **RT-PCR** | **PCR** | **RT-PCR** |
| *P. nicotianae* wild type | - | - | - | - |
| *P. nicotianae* + pCAMBIA 1201 | + | + | + | + |
| *P. nicotianae* + pVZA100 | + | + | + | - |
| pVZA100 plasmid DNA | + | na | + | na |
| | **Cutinase** | | **16S Ribosomal RNA** | |
| **Tissue Assayed** | **PCR** | **RT-PCR** | **PCR** | **RT-PCR** |
| *P. nicotianae* wild type | + | + | + | + |
| *P. nicotianae* + pCAMBIA 1201 | + | + | + | + |
| *P. nicotianae* + pVZA100 | + | - | + | + |
| pVZA100 plasmid DNA | + | na | - | na |

+ = Positive (gel band) - = Negative (no gel band) na = Not applicable

In the upper panel of **Table 9,** the data in the first column demonstrate that the hygromycin phosphotransferase gene was not present in the wild type *P. nicotianae*, but it was present in those cultures of *P. nicotianae* transformed with either the pCAMBIA 1201 plasmid alone or with pVZA100. The data in the second column demonstrate that the hygromycin phosphotransferase gene was expressed in all cultures in which it was present.

The data in the third column demonstrate that the GUS gene was not present in the wild type *P. nicotianae*, but it was present in those cultures of *P. nicotianae* transformed with either the pCAMBIA 1201 plasmid alone or with pVZA100. The data in the fourth column demonstrate that the GUS gene was being expressed only in the pCAMBIA 1201 transformed *P. nicotianae*, where no GUS silencing construct was present. However, GUS was silenced in all transgenic *P. nicotianae* cultures containing the pVZA100 silencing construct.

In the lower panel of **Table 9,** the data in the first column demonstrate that the fungal cutinase gene was present in the wild type *P. nicotianae*, as well as those cultures transformed with either the pCAMBIA 1201 plasmid alone or with the pVZA100 silencing construct, because cutinase is a constituitive gene of *P. nicotianae*. The data in the second column demonstrate that the fungal cutinase gene was expressed in both the wild type *P. nicotianae* as well as in the cultures transformed with the pCAMBIA 1201 plasmid. However, the cutinase expression was silenced in those *P. nicotianae* cultures transformed with the pVZA100 silencing construct.

The data in the third column demonstrate that the 16S ribosomal RNA gene was present in the wild type and all of the transgenic *P. nicotianae*, but not in the silencing

construct. The data in the fourth column demonstrate that the 16S ribosomal RNA gene was being expressed in both the wild type and transgenic *P. nicotianae* cultures.

Microscopic examination of cultures of *P. nicotianae* and *P.sojae* bombarded with pCAMBIA1201, pVZA100 and pVZA200 indicated that all grew normally like the wild type and with no visual malformations (Figure 14 A). Similar results were observed for cultures of *P. nicotianae* reisolated from infected wild type tobacco or tobacco transformed with pVZA100. However, those cultures of *P. nicotianae* bombarded with pVZA300 or pVZA400 (Figure 14 B, C, D) and those of *P.sojae* also bombarded with pVZA300 or pVZA400 (Figure 14 E, F) grew very slowly, their hyphae were severely malformed, and some cultures died.

Transformation of *P. nicotianae* and *P. sojae* with pCAMBIA1201 and pVZA200 had no deleterious effects on the fungi because those plasmids do not contain fungal genes and cannot induce silencing in those fungi. Furthermore, transformation of *P. nicotianae* and *P. sojae* with pVZA100, which contains the *P. nicotianae* cutinase gene, allowed them to grow normally, but caused both species to become nonpathogenic, because the cutinase gene, which is essential for pathogenicity, was silenced by pVZA100.

Transformation of *P. nicotianae* and *P. sojae* with pVZA300 or pVZA400, which contain the *P. infestans* elicitin and ribosomal RNA genes, respectively, both had marked deleterious effects on the growth and development of both *P. nicotianae* and *P. sojae*. There was insufficient growth even to provide enough inoculum for pathogenicity tests. This suggests that the elicitin and ribosomal RNA genes were silenced in the transformed fungi, and that silencing either of these important genes is very detrimental or lethal to the fungi. This is further supported by the fact that both pVZA 200 and pVZA300 contain the *Myzus persicae* cathepsin gene. But in addition, pVZA300 contains the *P. infestans* elicitin gene. Since pVZA200 caused no visible effects, and pVZA300 caused detrimental effects, the elicitin gene appears to be responsible for the malformation caused by pVZA300.

As above, where *P. nicotianae* cutinase induced plant resistance to other species of *Phytophthora*, these results demonstrate that essential genes from one species of *Phytophthora* (*P. infestans*), when introduced in silencing constructs, can cause very detrimental effects on other species of *Phytophthora* (*P. nicotianae* and *P. sojae*), which should be useful in controlling *Phytophthora spp.* directly in plants or by depathogenesis of infested soil and fields.

**Example 14. Demonstration of gene silencing in tobacco by siRNA detection**

Further proof that gene silencing is occurring is the detection of the small interfering RNAs (siRNAs) in the purportedly silenced transformed plants (Examples 5 and 13) and transformed fungus (Example 13). The siRNAs are 21 to 25 nucleotides (nt) in length, with homology to the mRNA that is being "silenced".

Total RNA was extracted from wild type and purportedly silenced transgenic T0 and T1 generation tobacco plants and wild type and purportedly silenced *P. nicotianae*. The RNA was separated by polyacrylamide gel electrophoresis, blotted to a membrane and hybridized with a probe transcribed from a 500 bp PCR product of the cutinase gene and labeled with $^{32}P$ by random priming. The hybridization and detection conditions were as in Example 9 above.

**Figures 4a and 4b** show the results of hybridization of the cutinase gene probe to RNAs from wild type and transgenic tobacco plants and transgenic *P. nicotianae*. In **Figure 4a**, lane 1 shows hybridization to a mixture of the 35 nt oligonucleotides VZA 3F (SEQ ID NO: 3) and VZA 4R (SEQ ID NO: 4). These were used to prime the PCR reaction to synthesize the template for production of the probe. Therefore, they are completely homologous to the template, and also of a known molecular size. Lanes 2 and 3 contain RNA from wild type tobacco plants. There is no hybridization because neither the cutinase gene nor the silencing construct are present in wild type plants, hence no siRNAs are produced. Lanes 4 to 11 contain the RNA from T0 and T1 generation plants of transgenic lines 4, 23, 26 and 27. The hybridization demonstrates the presence of the siRNAs in each of the transgenic plants, indicating the degradation of the cutinase mRNA, and the concomitant silencing of the cutinase gene in the transgenic plants.

In **Figure 4b**, lane 1 again shows hybridization to a mixture of the 35 nt oligonucleotides VZA 3F and VZA 4R. Lane 2 shows hybridization to the RNA from the wild type *P. nicotianae*. The intense spot 620 nt in length corresponds to the full length transcript of the cutinase gene in wild type *P. nicotianae*. The cutinase gene is constituitive in this culture, and no silencing construct is present. Therefore, the full length mRNA transcript survives and is not digested to siRNAs. Lanes 3 to 6 contain the RNA from four cultures of *P. nicotianae* transformed with the silencing construct. The hybridization demonstrates the presence of siRNAs in each of the transgenic cultures of *P. nicotianae*, indicating the degradation of the cutinase mRNA, and the concomitant silencing of the cutinase gene in the transgenic *P. nicotianae*.

Biological evidence for the silencing of the essential cutinase gene in transgenic *P. nicotianae* comes from the fact that those cultures transformed with the cutinase gene silencing construct, pVZA100, are rendered non-pathogenic, whereas those cultures

transformed with the pCAMBIA 1201 plasmid alone remain equally pathogenic to the wild type cultures from which they were derived. Further evidence of gene silencing in the presence of the pVZA100 silencing construct is provided by the GUS gene. The GUS reaction was always positive in those cultures that were transformed with pCAMBIA1201 and were pathogenic. Whereas it was always negative in those cultures that were transformed with pVZA100 and were nonpathogenic. This correlates directly with the activity or silencing of the cutinase gene in the same culture.

**Example 15. Highly homologous Phytophthora cutinase sequences useful herein.**

Analysis of *Phytophthora* gene sequences provides a basis for designing heterologous polynucleotides that confer cross-species resistance. As an illustration of the use of bioinformatic analysis to select pest pathogenicity gene sequences useful according to the present invention, 25 different isolates of *Phytophthora were* cloned and sequenced. Isolates included the nine species *P. capsici, P. cinnamomi, P. citricola, P. citrophthora, P. hevea, P. megakarya, P. megasperma* (*P. sojae*), *P. nicotianae* and *P. palmivora.* Each of these sequences (See Sequence ID Nos 13 to 37) are useful for polynucleotides of the present invention.

For example, nine of the sequences are identical and 11 are > 99% identical to the cutinase gene sequence of *P. nicotianae.* A shaded letter indicates a difference in sequence.

**Table 10. The nucleotide sequences of the cutinase genes of 25 isolates comprising 9 species of Phytophthora.**

| |
|---|
| (VZA 1 65R = Pnic Ri)<br>TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT<br>CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG<br>TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATGTGCTTGCTCTT<br>GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTCAGGTAGATGCACGACATGTTATCACCG<br>AATATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA<br>GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTC<br>GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACGTTACC<br>ATTGACGAACGTCACGAACCCACTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG<br>CGTAGTCAGCATCGGTGTA **(SEQ ID NO: 13)** |
| (VZA 2 69F = Pnic 21)<br>ACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCATCGCG<br>TCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCGTCCTC<br>CACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCTGT<br>GCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGTAT<br>CTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCCAC<br>TGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGCTC<br>TGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGAC<br>GAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAGCGTAGT<br>CAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACG **(SEQ ID NO: 14)** |

(VZA 3 73F = Pnic 23)
TCATACCATCTCGACAATGCTCAAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCATCAT
CGCGTCGGCTATCATGTCGTCGGTGCCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCGT
CCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGAAACTTGTTCATAATGTGCTTGCTCTTG
CTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTCAGGTAGATGCACGACTTGTTATCGCCGAG
TATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCTTCACAGAGTCCACGTAGCC
ACTGTAGATATCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTA
CTCTGTACGTTGATCTCTTGCTTCCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTG
ACGAACGTCACGAACCC **(SEQ ID NO: 15)**

(VZA 4 88F = Pnic 17)
TCATACCATCACGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGGG **(SEQ ID NO: 16)**

(VZA 5 62R = Pcap Ri)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCG **(SEQ ID NO: 17)**

(VZA 6 70F = Pcap 30)
CCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCATCGCGT
CGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCTAATCCGTAGCTGCTCGTCCTCC
ACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCTGTG
CTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGTATCT
CCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCCACTG
TAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGCTCTG
TGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGACGA
ACGTCACGAACCCGCTAACACTCT **(SEQ ID NO: 18)**

(VZA 7 72F = Pcap 30)
CTATAACGACAATGCCTCGAACTGGGCCTTCGGCAACGGCTTCGTCATCGCG
TCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCGTCCTC
CACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCTGT
GCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGTAT
CTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCCAC
TGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGCTC
TGTGCGTTGATCTCCTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGAC
GAACGTCACGAACCCGCTAACACTCT **(SEQ ID NO: 19)**

(VZA 8 79F = Pcap 28)
ACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCATCGCG
TCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCGTCCTC
CACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCTGT
GCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGTAT
CTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCCAC
TGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGCTC
TGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGAC
GAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAGCGTAGT
CAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCC **(SEQ ID NO: 20)**

(VZA 9 84F = Pcap 01)
TAATACCACTCGACAATGCATCGAACTTGACCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCATCATGTCGTCGGTACCAACATGCCGAATCCGTAGCTGCTCGTC
CTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGC
TGTGCTTGCCAGGCTTGGCAATTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGT
ATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACATAGCC
ACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGCG
CTCTGTGCGTTGAACCCTTGCTTTCTTGATCCTCACTAAACCACATTGCCATTG
ACGAACGTCACTAACCCTCTAACACTCTTTAGATCATTAATATCATTAGCCTA
ATCAACAAACTCCTAATACCTCAGATTCACTACAATCC **(SEQ ID NO: 21)**

(VZA 10 87F = Pcap 32)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGGC **(SEQ ID NO: 22)**

(VZA 11 89F = Pcap 03)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTCAGATTCACGTCGTT **(SEQ ID NO: 23)**

(VZA 12 90F = Pcap 22)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEQ ID NO: 24)**

| |
|---|
| (VZA 13 91F = Pcap 25)<br>TCAAACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT<br>CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCAAATCCGTAGCTGCTCG<br>TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT<br>GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG<br>AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA<br>GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT<br>GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC<br>ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG<br>CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGGG **(SEQ ID NO: 25)** |
| (VZA 14 81F = Ppal 02)<br>TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT<br>CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG<br>TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT<br>GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG<br>AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA<br>GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT<br>GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC<br>ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG<br>CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEQ ID NO: 26)** |
| (VZA 15 82F = Ppal 10)<br>TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT<br>CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG<br>TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT<br>GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG<br>AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA<br>GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT<br>GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC<br>ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG<br>CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCG **(SEQ ID NO: 27)** |
| (VZA 16 83F = Ppal 11)<br>TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT<br>CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG<br>TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT<br>GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG<br>AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA<br>GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT<br>GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC<br>ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG<br>CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGGC **(SEQ ID NO: 28)** |
| **(VZA17 85F = Ppal 04)**<br>TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT<br>CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG<br>TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT<br>GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG<br>AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA<br>GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT<br>GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC<br>ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG<br>CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEQ ID NO: 29)** |

(VZA 18 86F = Ppal 05)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGGG **(SEQ ID NO: 30)**

(vza 19 64R = Pcin Ri)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAAGCCGTTGCCTCGTC
CTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGC
TGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGT
ATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCC
ACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGC
TCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGATTCGGTCATCAGGGTCA
TTAGCGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACG TCAGATTCACGTCGTTCCCGG
**(SEQ ID NO: 31)**

(VZA 20 77F = Pcin 01)
ATCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCATCGCG
TCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAAGCCGTAGCCTCGTCCTC
CACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCTGT
GCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGTAT
CTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCCAC
TGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGCTC
TGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGAC
GAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAGCGTAGT
CAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEQ ID NO: 32)**

(VXA 21 63R = Pcto Ri)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAAGCCGTTGCCTCGT
CCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTG
CTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGA
GTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAG
CCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGT
GCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATT
GACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAGCG
TAGTCAGCATCGGTGTAGCACG TCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEQ ID NO: 33)**

(VZA 22 66R = Pctr Ri)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACGTGGGATCGGCGTTGCTCGTCC
TCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCT
GTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGT
ATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCC
ACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGC
TCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGA
CGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAGCGTA
GTCAGCATCGGTGTAGCACG **(SEQ ID NO: 34)**

(VZA 23 80F = Pmek 01)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGGCAA **(SEQ ID NO: 35)**

(VZA 24 92F = Pmeg 01)
CAGACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCATC
GCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCTAATCCTTAGCTGCTCATC
CTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGC
TGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGT
ATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCC
ACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGC
TCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGA
CGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGTCATTAGCGTA
GTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCG **(SEQ ID NO: 36)**

(VZA 25 93F = Phev 02)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTGCCAACATGACGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACAAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGT **(SEQ ID NO : 37)**

Without being bound by theory, these cutinase sequences provide the molecular basis for the cross resistance demonstrated above and support the general application of gene sequencing and bioinformatic analysis to select other pest pathogenicity genes with similar outcomes.

**Example 16. <u>Intergeneric resistance in tobacco was conferred by the P. nicotianae cutinase gene-silencing to a disease caused by a Peronospora tabacina</u>**

A natural epidemic of the blue mold disease of tobacco caused by *Peronospora tabacina* occurred in the greenhouse containing the tobacco plants. Clear differences in blue mold severity were observed. Three genotypes of plants were available for evaluation: Transgenic plants containing the cutinase gene and which had already been selected for resistance to *P. nicotianae*, cutinase transgenic plants which had not yet been selected for resistance to *P. nicotianae*, and wild type or non-transgenic Xanthi tobacco plants. The numbers in the photographs in **Figure 5** refer to the different disease ratings, not the different plant lines or genotypes.

**Table 11. Reactions of Different Tobacco Genotypes to a Natural Epidemic of Blue Mold of Tobacco Caused by *Peronospora tabacina* in the Greenhouse**

| Tobacco Genotype | Disease Rating and Analysis | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1* | 2 | 3 | 4 | #Plants 1+2 | #Plants 3+4 |
| Phytophthora resistant | 34** | 11 | 9 | 12 | 45 (68)*** | 21 (32) |
| Unselected transgenic | 62 | 20 | 67 | 26 | 82 (47) | 93 (53) |
| Wild Type Xanthi | 0 | 3 | 12 | 30 | 3 (7) | 42 (93) |

* = Disease ratings.
** = Number of plants in that class.
*** = Percentage of plants in that class.

1 = Symptomless
2 = Obvious symptoms
3 = Severe symptoms
4 = Dead or dying

Table 11 shows that among the *P. nicotianae* resistant plants, 68% of them were moderately affected by *Peronospora tabacina* (disease ratings 1 + 2), and 32 % were severely affected (disease ratings 3 + 4); about a 2:1 ratio in favor of resistance to *Peronospora tabacina*. For the transgenic unselected plants, 47% were moderately affected and 53 % severely affected; about a 1:1 ratio in favor of resistance to *Peronospora tabacina.* Of the wild type plants, 7% were moderately affected and 93% were severely affected; about a 13:1 ratio in favor of susceptibility. Therefore, **Figure 5** and Table 11 clearly demonstrate different levels of resistance in the different tobacco genotypes, and that the cutinase gene from *P. nicotianae* induces broad based resistance in tobacco to *Peronospora tabacina,* a fungus distantly related to *P. nicotianae.*

Table 12 demonstrates that *Phytophthora nicotianae* and *Peronospora tabacina* are not closely related taxonomically. Yet, as shown above, the *Phytophthora nicotianae* cutinase gene confers resistance to both *Phytophthora nicotianae* and *Peronospora tabacina.* Therefore, the *Phytophthora nicotianae* cutinase gene provides broad resistance against at least three different fungal species and three fungal diseases. It protects against two different species of *Phytophthora, P. nicotianae* in tobacco and *P. sojae* in soybeans, and it also protects tobacco against both *Phytophthora nicotianae* and *Peronospora tabacina.* These two fungal species are classified in the same order, but in distinctly different families and genera **(Table 12)**.

82
82

**Table 12. Taxonomic relationship between *Phytophthora nicotianae* and *Peronospora tabacina***

| | *Phytophthora nicotianae* | *Peronospora tabacina* |
|---|---|---|
| Class | Oomycetes | Oomycetes |
| Order | Peronosporales | Peronosporales |
| **Family** | Pythiaceae | Peronosporaceae |
| **Genus** | *Phytophthora* | *Peronospora* |
| **Species** | *Phytophthora nicotianae* | *Peronospora tabacina* |

**Example 17. Soybeans transformed and made resistant with Phytophthora gene silencing constructs**

Soybean tissue culture: Shoots emerged from many of the soybean embryos transformed with pVZA100 (Example 7) by *A. tumefaciens* and by biolistics (**Figure 6**). Other calli on the plate remained green and became very friable (**Figure 7A**). DNA was extracted from three samples each of the shoots and friable calli, and PCR was performed using the oligonucleotide primers designed to amplify the GUS (SEQ ID NOs: 9 and 10) and hygromycin phosphotransferase (SEQ ID NOs: 11 and 12) genes.

Both the GUS and hygromycin phosphotransferase genes (HPT) were detected in the soybean callus, as shown in **Figure 7B.** The upper panel of **Figure 7B** shows that all 6 of the samples (lanes 1-6) were transgenic for HPT (lane 7 is the plasmid control). The lower panel shows that at least 4 (lanes 1, 2, 4, 5) of the 6 samples were transgenic for the GUS gene (lane 7 is the plasmid control). These data demonstrate that the host plant cells were transgenic with the pVZA100 heterologous polynucleotide.

The continued growth of the plantlets and shoots on the medium containing 15 mg/L of hygromycin demonstrate that the calli expressed the heterologous polynucleotide.

The fact that the soybean calli were GUS negative in their staining reaction demonstrated that GUS expression in the host plant cell was silenced by the heterologous polynucleotide.

Next, the calli are grown, rooted, transplanted to soil, and grown to maturity to obtain pollen and seed. Non transformed plants are pollinated with pollen from a mature transformed plant, and the resultant fertilized seed is grown to a mature plant. Mature plants (F0 plants), plants grown from seeds of an F0 plant, and non- transformed plants regenerated from seeds from transformed plant pollen and non-transformed plant flowers all show resistance to *Phytophthora sojae.*

Soybean plants: This example (17) with soybean tissue culture was clearly demonstrated in Example 27 wherein soybean plants transformed by bombardment with pVZA100 were resistant to *P. sojae* (**Figure 13**). This result also demonstrates that broad resistance was conferred by the cutinase gene of *P. nicotianae* against *P. sojae*.

**Example 18 Potatoes transformed and made resistant to Phytophthora infestans.**

From Example 7, both roots and minitubers were produced in the culture plates (**Figure 8**). The plantlets, roots, and minitubers grew on the medium containing 15 mg/L of hygromycin demonstrating that the calli were transformed and expressing the hygromycin phosphotransferase transgene. Potato calli transformed with pCAMBIA1201 were GUS positive staining, whereas potato calli transformed with pVZA100 were GUS negative staining. This demonstrates that GUS was silenced in those tissues transformed with pVZA100.

PCR analysis demonstrates the presence of the transgenes. Progeny plants from cuttings and tubers test positive for siRNAs.

The potatoes transformed with the silencing construct are resistant to *Phytophthora infestans*.

Potato plants: This example (18) with potato tissue culture was clearly demonstrated in Example 27 wherein potato plants transformed by bombardment with pVZA300 and pVZA400 were resistant to *P. infestans*.

**Example 19. Soybeans are made resistant to brown stem rot (Phialophora gregata rDNA)**

Soybean host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Phialophora gregata* ribosomal RNA gene (rDNA) (GenBank locus U66728, SEQ ID NO: 43). Soybean plants are generated from transformed cells and are successfully selected for conferred resistance to brown stem rot following inoculation with *Phialophora gregata*. Plants resistant to *Phialophora gregata* are also resistant to *Phakopsora pachyrhizi* and *Aspergillus nidulans*.

**Example 20. Soybeans are made resistant to brown stem rot (Phialophora gregata genotype B DNA marker)**

Soybean host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Phialophora gregata* ribosomal RNA gene (rDNA) (GenBank locus U66728, SEQ ID NO: 44). Soybean plants are generated from transformed cells and are successfully selected for conferred resistance to brown stem rot following inoculation with *Phialophora gregata*.

'lants resistant to *Phialophora gregata* are also resistant to *Phakopsora pachyrhizi* and *Aspergillus nidulans*.

**Example 21. Soybeans are made resistant to stem and root rot (Phytophthora ojae cutinase)**

Soybean host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA 100 Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Phytophthora sojae* utinase (i.e. SEQ ID NO: 36). Soybean plants are generated from transformed cells and are uccessfully selected for conferred resistance to stem and root rot following inoculation with *Phytophthora sojae*.

**Example 22. Soybeans are made resistant to white mold disease (Sclerotinia clerotiorum RNA polymerase subunit)**

Soybean host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Sclerotinia clerotiorum* partial rpb2 gene for RNA polymerase II second largest subunit, exon 1, strain 84 (GenBank locus AJ745716, SEQ ID NO: 45). Soybean plants are generated from ransformed cells and are successfully selected for conferred resistance to white mold disease ollowing inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum*. Plants resistant to *Sclerotinia clerotiorum* are also resistant to *Phakopsora*, *Aspergillus nidulans*, *Magnaporthae orizae*, *Candida sojae*, *Gibberella zeae*, and *Puccinia graminis*. Transformed plants show normal growth, lacking a gene with high homology to the *S. sclerotiorum* rpb2 gene. Similar results re obtained using sense and antisense sequences corresponding to *Puccinia hordei* 18S ibosomal RNA gene, partial sequence of GenBank locus AY125412 (SEQ ID NO: 46).

**Example 23. Soybeans are made resistant to white mold disease (Sclerotinia clerotiorum hexose transporter)**

Soybean host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Sclerotinia clerotiorum* hexose transporter (*hxt2*) gene (GenBank locus AY647268.1, SEQ ID NO: 47). Soybean plants are regenerated from transformed cells and successfully selected for conferred esistance to white mold disease following inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum*. Plants esistant to *Sclerotinia sclerotiorum* also demonstrate some resistance to *Botrytis cinerea*.

**Example 24. Soybeans are made resistant to sudden death syndrome (Fusarium solani pisi cutinase)**

Soybean host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *F. solani pisi* cutinase mRNA (GenBank locus K02640.1, SEQ ID NO: 48) Soybean plants are regenerated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to sudden death syndrome following inoculation with *Fusarium solani glycines*. Plants resistant to *Fusarium solani glycines* show some increased resistance to *A. nidulans*.

**Example 25. Soybeans are made resistant to Asian rust (Phakopsora pachyrhizi cutinase homolog)**

Soybean host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Phakopsora pachyrhizi* conserved protein motif of *Phytophthora nicotianae* and found in the *Phakopsora pachyrhizi* genome (GenBank locus AC149367.2, SEQ ID NO: 49). Based on homology with *Phytophthora nicotianae* cutinase, this conserved protein motif is likely a cutinase homologue and involved in penetrance of the soybean cutin. Soybean plants are regenerated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to Asian rust following inoculation with *Phakopsora pachyrhizi.*

**Example 26. Soybeans are made resistant to Asian rust (Phakopsora pachyrhizi rDNA)**

Soybean host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to a ribosomal DNA sequence found in the *Phakopsora pachyrhizi* genome (GenBank locus AF333491, SEQ ID NO: 50). Soybean plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to Asian rust following inoculation with *Phakopsora pachyrhizi.*

**Example 27. Testing of tobacco, soybean, potato and corn for transgenesis, resistance to Phytophthora spp. and resistance to aphids**

***Tobacco.***

Mature tobacco plants produced in Example 5 by transformation with pVZA100 were tested for resistance against *P. nicotianae*. Three methods were tested for inoculation with *P. nicotianae*. All gave satisfactory results, but as explained above, the toothpick method was more rigorous and more dependable. Generally about 20 % of the T0 plants transformed with

pVZA100 (initial transgenic generation) survived infection with *P. nicotianae*, whereas 0% of the wild type plants and those plants transformed with pCAMBIA 1201survived.

Surviving plants transformed with pVZA100 were grown to maturity in soil, and seed was collected for subsequent analysis. The seed progeny (= T1 generation) were grown on MS medium containing 30ug/ml hygromycin, and the surviving plants again tested for resistance to *P. nicotianae*.

Surviving transformed plants also were grown to maturity in soil and seed collected for subsequent analysis. A group of seed progeny (= T2 generation) of four different lines (lines #4, #23, #26 and #27; = different transformation events) of these plants were inoculated twice successively to ensure that any survivors were resistant to *P. nicotianae*. In the first inoculation 192 of 442 plants were resistant (= 43%). Upon reinoculation: 150 of 192 plants were resistant (= 78%). In summary, 150 of 442 plants were resistant (= 34%). All of these 150 resistant plants were also assayed for GUS activity and found to be negative.

Reactions by tobacco plants are shown in Figure 11. Plant A shows reactions typical of wild type tobacco plants or those transformed with pCAMBIA1201. The plants are susceptible, there are major stem lesions, and the root system is essentially destroyed. Such plants usually die 5-8 days after inoculation. Plant B is from Transgenic line 26 (see below). It is typical of those plants transformed with pVZA100. It was highly resistant to *P. nicotianae* and showed no symptoms other than small lesions on the tips of the upper roots. Such plants grow to maturity and set fertile seed.

***pVZA100 in Soybean:***

Soybean plants were bombarded with pVZA100. PCR with the appropriate primers demonstrated that 15 of 32 bombarded plants were transgenic. Transgenic plants were cultivated to produce seeds and seed plants were tested for resistance to *P. sojae*. As shown in Figure 13, 43 of 495 seed plants tested were resistant to *P. sojae* (Figure 13) whereas 100% of a similar number of wild-type and pCAMBIA1201 transformed (i.e. "control-transformed") plants died.

***pVZA100 in Potato***

Potato plants were bombarded with pVZA100. PCR with the appropriate primers demonstrated that 15 of 18 bombarded plants were transgenic. Transgenic plants are tested for resistance to *P. infestans*. *100%* of these plants are resistant as compared to 0% resistance in wild-type or control-transformed plants.

***pVZA100 in Corn***

Corn plants were bombarded with pVZA100. PCR with the appropriate primers demonstrated that 33 of 44 bombarded plants were transgenic. Transgenic plants are cultivated to produce seeds and seed plant are tested for resistance to *Pythium graminicola.* 25% of the F1 plants tested are resistant as compared to 0% resistance in wild-type or control-transformed plants.

The above results demonstrate that plants useful in the present invention include monocots and dicots.

Similarly, corn plants are transformed with pVZA100 and tested and illustrate cross resistance to *Phytophthora* and *Peronospora.*

***pVZA200 in Potato***

Potato plants were bombarded with pVZA200 (*Myzus persicae* Cathepsin B). PCR with the appropriate primers demonstrated that 7 of 12 bombarded plants were transgenic. Transgenic plants are tested for resistance to aphids (*Myzus persicae).* 80% of such plants, compared to 0% of contol or wildtype plants, are resistant.

Aphids after feeding on transformed plants are examined. It is determined that silencing cathespin B in aphids according to the present invention not only protects the plant (i.e. causes aphid resistance in plants) but also reduces the aphid population.

According to the present invention and this example, insect resistance is conferred to plants through transformation with a silencing construct containing an insect gene such as Cathepsin B.

***pVZA300 in Potato***

Potato plants were bombarded with pVZA300, a construct containing sense and antisense sequences homologous and complementary to Cathepsin B from *Myzus persicae* and elicitin INF1 of *Phytophthora infestans.* PCR with the appropriate primers demonstrated that 15 of 18 bombarded plants were transgenic. Such transgenic plants are tested for resistance to aphids (*Myzus persicae)* and to *Phytophthora infestans.*

In one set of experiments, one group of transformed potato plants are challenged with aphids only and one group is challenged with *Phytophthora infestans only.*

For the aphid challenged plants, 80% of such plants tested are resistant as compared to 0% resistance in wild-type or control-transformed plants.

For the *Phytophthora infestans* challenged plants, 75% of such plants tested were resistant as compared to 0% resistance in non-transformed or control plants.

In another set of experiments, similarly transformed and non-transformed potato plants are challenged with aphids and *Phytophthora infestans* at the same time. 60% of the transgenic plants tested are resistant to both pests as compared to 0% resistance in wild-type or control-transformed plants.

After feeding on transformed plants, *Phytophthora infestans* is isolated and cultured. Such cultures either grow very slowly or die. Microscopic examination reveals that the hyphae are severely malformed.

Moreover, silencing rRNA according to the present invention further illustrates an embodiment whereby the pathogen population in the soil is dramatically reduced.

***pVZA300 in Soybeans***

Soybean plants were bombarded with pVZA300 (a construct containing sense and antisense sequence homologous and complementary to Cathepsin B from *Myzus persicae* and elicitin INF1 of *Phytophthora infestans*). PCR with the appropriate primers demonstrated that 60% of bombarded plants are transgenic. Transgenic plants are cultivated to produce seeds and seed plants are grown. Such F1 plants are tested for resistance to aphids (*Myzus persicae)* and to *Phytophthora sojae.*

In one set of experiments, one group of transformed soybean plants are challenged with aphids only and one group is challenged with *Myzus persicae* only.

For the aphid challenged plants, 70% of the F1 plants tested are resistant as compared to 0% resistance in wild-type or control-transformed plants.

For the *Phytophthora sojae* challenged plants, 15% of the F1 plants tested are resistant as compared to 0% resistance in wildtype and in control transformed plants.

In another set of experiments, transformed and non-transformed soybeans plants are challenged with aphids and *Phytophthora sojae* at the same time. 10 % of the F1 plants tested are resistant to both pests as compared to 0% resistance in wild-type or control-transformed plants.

According to the present invention and these examples, insect resistance and fungus resistance is conferred in a plant (both for moncot and dicot species) by a single heterologous polynucleotide comprising a plurality of genes (i.e. by gene stacking). Moreover, a surprising level of pest resistance is conferred in plants by silencing genes from more than one pest.

After feeding on transformed plants, *Phytophthora sojae* is isolated and cultured. Such cultures either grow very slowly or die. Microscopic examination reveals that the hyphae are severely malformed.

***pVZA400 in Soybeans***

Soybean plants were bombarded with pVZA400 comprising antisense and sense sequences homologous and complementary to the rRNA gene of *Phytophthora infestans*. PCR with the appropriate primers demonstrated that 12 of 18 bombarded plants were transgenic. Transgenic plants are cultivated to produce seeds and seed plants are tested for resistance to *Phytophthora sojae*. 15% of the F1 plants that are tested are resistant as compared to 0% resistance in non-transformed or control transgenic plants.

After feeding on transformed plants, *Phytophthora sojae* is isolated and cultured. Such cultures either grow very slowly or die. Microscopic examination reveals that the hyphae are severely malformed.

Next, wild-type soybeans are challenged with *Phytophthora sojae* cultures derived from the pVZA400-transformed plants. Such *P. sojae* cultures are non pathogenic in comparison to *sojae* cultures which are derived from wild-type or control-transformed soybeans.

The above results illustrate the usefulness of silencing of rRNA in a pest (e.g. fungi) and further illustrates cross resistance to a pest species other than the pest from which the pest pathogenicity gene was constructed.

After feeding on transformed plants, *Phytophthora sojae* is isolated and cultured. Such cultures either grow very slowly or die. Microscopic examination reveals that the hyphae are severely malformed.

Moreover, silencing rRNA according to the present invention further illustrates an embodiment whereby the pathogen population in the soil is dramatically reduced.

***pVZA400 in Potato***

Potato plants were bombarded with pVZA400 comprising antisense and sense sequences mologous and complementary to the rRNA gene of *Phytophthora infestans*. PCR with the appropriate primers demonstrated that 6 of 12 bombarded plants were transgenic. Transgenic plants were cultivated and tested for resistance to *Phytophthora infestans*. These plants were tested and showed resistance in 100% of these plants as compared to 0% resistance in wild-type or control-transformed plants.

After feeding on transformed plants, *Phytophthora infestans* is isolated and cultured. Such cultures either grow very slowly or die. Microscopic examination reveals that the hyphae are severely malformed.

The above results illustrate the usefulness of a single silencing construct of rRNA in conferring pest resistance in a plurality of plants to a pest (e.g. fungi).

**Example 28. Potato is made resistant to tuber rot (Fusarium sambucinum translation elongation factor 1 alpha)**

Potato host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to a *Fusarium sambucinum* translation elongation factor 1 alpha DNA sequence (GenBank locus AJ543605, SEQ ID NO: 51). Potato plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to *Fusarium sambucinum* tuber rot.

**Example 29. Tomato is made resistant to late blight (Phytophthora infestans elicitin gene)**

Tomato host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to an elicitin gene sequence found in the *Phytophthora infestans* genome (GenBank locus AY766228, SEQ ID NO: 52). Tomato plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to late blight of tomato following inoculation with *Phytophthora infestans*.

**Example 30. Canola is made resistant to stem rot (Sclerotinia sclerotiorum RNA polymerase subunit)**

Canola host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to a *Sclerotinia sclerotiorum* partial rpb2 gene for RNA polymerase II second largest subunit , exon 1, strain 484 1096 bp (GenBank locus AJ745716, SEQ ID NO: 53). Canola plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to stem rot following inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum.*

**Example 31. Cotton is made resistant to cotton wilt (Fusarium solani pisi cutinase homolog)**

Cotton host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to a cutinase gene from *F. solani pisi* (GenBank locus K02640.1, SEQ ID NO: 48). This sequence is

picked herein because of the homology of genes within the genus *Fusarium*. Cotton plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to cotton wilt following inoculation with *Fusarium oxysporum*.

**Example 32. Corn is made resistant to mycotoxins (F. solani pisi cutinase)**

Corn host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to a cutinase gene from an *F.solani pisi* (GenBank locus K02640.1, SEQ ID NO: 48). This sequence is picked herein because of the homology of genes within the genus *Fusarium*. Corn plants are generated from transformed cells and selected for increased resistance to mycotoxins following inoculation with *Fusarium moniliforme*.

**Example 33. Corn is made resistant to stalk rot (Stenocarpella maydis rDNA)**

Corn host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Stenocarpella maydis* rRNA (GenBank locus AY332489, SEQ ID NO: 54). This sequence is picked herein because of the homology of genes within the genera *Stenocarpella* and *Fusarium*. Corn plants are generated from transformed cells and selected for increased resistance to stalk rot following inoculation with *Stenocarpella maydis* and several *Fusarium spp.*

**Example 34. Corn is made resistant to leaf blight (Cercospora zeae-maydis 18s rDNA)**

Corn host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to 18S ribosomal RNA from a Cercospora zeae-maydis Group II (GenBank locus AF291710, SEQ ID NO: 55). Corn plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to leaf blight following inoculation with *Cercospora zeae-maydis*.

**Example 35. Potato is made resistant to green peach aphid (Myzus persicae cathepsin B protease)**

Potato host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to Cathepsin B protease from *Myzus persicae* (GenBank locus AY702822, SEQ ID NO: 56). Potato plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to green peach aphids following inoculation with *Myzus persicae*.

**Example 36. Potato is made resistant to Colorado potato beetle (Leptinotarsa decemlineata cysteine protease)**

Potato host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to cysteine protease from *Leptinotarsa decemlineata* (GenBank locus AY159377, SEQ ID NO: 57). Potato plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to Colorado potato beetle following inoculation with *Leptinotarsa decemlineata.* Such regenerated potatoes demonstrate increased resistance to each of the following: *Callosobruchus maculates, Diabrotica virgifera virgifera, Acanthoscelides obtectus, Helicoverpa armigera, Leptinotarsa decemlineata, Anthonomus grandis, Triatoma infestans, Tenebrio molitor, Toxoptera citricida, Aphis gossypii, Pandalus borealis, Myzus persicae, Delia radicum, Sarcophaga peregrine, Sitophilus zeamais, Boophilus microplus, Hypera postica, Frankliniella occidentalis,* and *H. americanus.*

**Example 37. Potato is made resistant to Verticillium wilt (V. dahliae rDNA)**

Potato host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Verticillium dahliae* rDNA (GenBank locus AF108478, SEQ ID NO: 58). Potato plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to Verticillium wilt following inoculation with *Verticillium dahliae.*

**Example 38. Soybeans are made resistant to downy mildew (Peronospora berteroae rDNA)**

Soybean host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to internal transcribed spacer 1 partial sequence of 5.8S ribosomal RNA found in the *Peronospora berteroae* genome (GenBank locus AY531450, SEQ ID NO: 59). Soybean plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to downy mildew following inoculation with *Peronospora manchurica.* Such selected soybeans also have increased resistance to *Hyaloperonospora* species (e.g. *H. camelinae, H. niessleana, H. parasitica,* and *H. thlaspeos-perfoliati*) and *Peronospora* species (e.g. *P. arabidopsidis, P. arabis–alpinae, P. buniadis, P. cardaminopsidis, P. cochleariae, P. dentariae, P. galligena, P. hesperidis, P. iberidis, P. isatidis, P. nesleae, P. sisymbrii–loeselii, P. sisymbrii-officinalis, P. sisymbrii-sophiae, P. thlaspeos-alpestris,* and *P. thlaspeos-arvensis*).

**Example 39. Potato is made resistant to potato root knot nematode (Meloidogyne chitwoodi cytochrome oxidase II)**

Potato host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to a sequence found in the *Meloidogyne chitwoodi* genome (i.e. cytochrome oxidase subunit II gene, (GenBank locus AY757882, SEQ ID NO:60). Potato plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to potato root knot following inoculation with *Meloidogyne chitwoodi.* Such selected potato plants are also found to be resistant to *Bombyx mandarina, Bombyx mori, Chilo tumidicostalis, Hemileuca, Hydrotaea aenescens, Meloidogyne hapla, Meloidogyne partityla, Oecetis avara, Papilio aegeus, Papilio demoleus, Papilio erithonioides, Papilio hipponous, Papilio oribazus, Papilio protenor, Papilio troilus, Papilio xuthus, Sabethes cyaneus,* and *Samia cynthia ricini.*

**Example 40. Soybeans are made resistant to nematode infestation (Pratylenchus scribneri and Heterodera glycines ribosomal RNA genes)**

The present invention can be used to produce host plants with increased resistance to additional nematodes. Nematode polynucleotide sequences that are known and are searchable in public databases such as the NCBI/NIH GenBank demonstrate conserved nucleotide motifs among different nematode genera. Conserved nucleotide motifs strongly suggest that these sequences are associated with viability and/or parasitism and are functionally conserved and expressed in both *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode) and *Globodera rostochiensis* and *Globdera pallids* (potato cyst nematodes), and also in the well studied *Heterodera glycines* and *Caenorhabditis elegans*. Thus, the use of these sequences and variants thereof, is advantageous because such RNAi can be designed to have broad RNAi specificity and are thus useful for controlling a large number of plant parasitic nematodes *in planta*. Because genes identified herein are associated with nematode survival and/or parasitism, RNAi inhibition of these genes (arising from contacting nematodes with compositions comprising RNAi molecules such as, for example, by allowing nematodes to feed on plants transformed as taught herein) prevents and/or reduces parasitic nematode growth, development, and/or parasitism.

Nematode feeding is a useful indicator of the effectiveness of the methods of the present invention. The *Pratylenchus scribneri in vitro* feeding assay uses a corn root exudate as a feeding stimulus and both the red dye Amaranth, or potassium arsenate, as feeding indicators. Feeding is confirmed after seven days by the presence of red stained intestinal cells in live worms exposed to the Amaranth or death of worms exposed to arsenate. *P. scribneri* can be cultured on wild type roots of corn, rice and *Arabidopsis*, and on *Agrobacterium*

*rhizogenes*-induced hairy roots of sugar beet and tomato. *P. scribneri* is very valuable in evaluating transgenic hairy roots (ideally developed by use of *Agrobacterium rhizogenes* strains known in the art as transformation vectors) because of the non-specific feeding of these worms.

Corn, rice, tomato, and sugar beets are transformed with a heterologous polynucleotide containing complementary sense and antisense sequences of *P. scribneri* ribosomal RNA (GenBank locus SEQ ID NO:61). *P. scribneri* is tested on a feeding assay using transformed and wild type corn, rice, tomato, and sugar beets. Transformed plants demonstrate increased resistance to *P. scribneri*.

Soybeans are transformed with a heterologous polynucleotide containing complementary sense and antisense sequences of *Heterodera glycines* ribosomal RNA (GenBank locus AY667456, SEQ ID NO: 62). *Heterodera glycines* is tested on a feeding assay using transformed and wild type soybeans. Transformed soybeans demonstrate increased resistance to *Heterodera glycines*.

**Example 41. Various Plants are made resistant to infection by various Phytophthora spp. (Phytophthora nicotianae cutinase)**

In one embodiment, the pVZA100 heterologous polynucleotide (Example 3) is used to transform a variety of plants to confer resistance to various *Phytophthora* species. For example, resistance is conferred against *Phytophthora spp.*-induced leaf and stem infections when any of *Chrysalidocarpus palm, Catharanthus, Dendrobium*, poinsettia, impatiens, sage, spathiphyllum, or onion is transformed with the pVZA100 (SEQ ID NO: 5). Resistance is conferred against *Phytophthora spp.*-induced root rot when any of poinsettia, tomato, pineapple, or anthurium is transformed with the pVZA100.

Resistance is conferred against *Phytophthora spp.*-induced crown and collar rots when any of watermelon, protea, or African violet is transformed with the pVZA100.

Resistance is conferred against *Phytophthora spp.*-induced fruit rots when any of tomato, papaya, or eggplant is transformed with the pVZA100.

**Example 42. Agave is made resistant to Agave root rot (Fusarium solani pisi cutinase)**

Agave host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to a cutinase gene from *Fusarium solani pisi* (GenBank locus K02640.1, SEQ ID NO: 48) This sequence is picked herein because of the homology of genes within the genus *Fusarium*. Agave plants are

generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to Agave rot following inoculation with *Fusarium oxysporum*

**Example 43. Rice is made resistant to blast disease (Magnaporthe grisea RNA polymerase II)**

Rice host cells are transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to a *Magnaporthe grisea* RNA polymerase II sequence of (GenBank locus XM 362268, SEQ ID NO: 63). Transformation was accomplished by electroporation or *Agrobacterium tumefaciens*. Rice plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to rice blast disease following inoculation with *Magnaporthe grisea*.

**Example 44. Various plants are made resistant to Phytophthora–induced root disease (Phytophthora citricola cutinase)**

Various plants cells including those from *Rhododendron (*e.g. *Rh. catawbiense, Rh. simsii, Rh. Catawbiense), Erica sp., Calluna sp.,* avocado trees, citrus trees, and hops are transformed with the heterologous polynucleotide pVZA100 (Example 3). This construct was chosen because of the homology between *Phytophthora nicotianae* SEQ ID NO: 14 and *Phytophthora citricola* SEQ ID NO: 34. Host plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to disease following inoculation with *Phytophthora citricola.*

**Example 45. Barley is made resistant to barley leaf rust (Puccinia hordei 18S ribosomal RNA)**

Barley cells are transformed with the heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Puccinia hordei* 18S rRNA (GenBank locus AY125412, SEQ ID NO:64). Host plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to barley leaf rust following inoculation with *Puccinia hordei.*

**Example 46. Barley is made resistant to downy mildew (Pseudoperonospora humuli rDNA)**

Barley cells are transformed with the heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to sequences from *Pseudoperonospora humuli* isolate HV 148 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA (GenBank locus AY198305, SEQ ID NO: 65). Host plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to downy mildew following inoculation with *Pseudoperonospora humuli.*

**Example 47. Barley is made resistant to gray mold disease (Botrytis cinerea cytochrome P450 monoxygenase)**

Barley cells are transformed with the heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to sequences from *Botrytis cinerea* for *aba*2 gene for cytochrome P450 monoxygenase, exons 1-5 (GenBank locus AJ851088, SEQ ID NO: 66). Host plants are generated from transformed cells and successfully selected for conferred resistance to gray mold disease following inoculation with *Botrytis cinerea.*

**Example 48. Tomato is made resistant to tomato speck disease (Pseudomonas syringae rDNA)**

Tomato cells are transformed with the heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Pseudomonas syringae* ribosomal RNA (GenBank locus AY342210, SEQ ID NO: 67). Host plants are generated from transformed cells and are successfully selected for conferred resistance to tomato speck disease following inoculation with *Pseudomonas syringae.*

**Example 49. Tomato is made resistant to bacterial wilt (Clavibacter michiganense michiganense Cel A gene)**

Tomato cells are transformed with the heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Clavibacter michiganense michiganense* Cel A gene (GenBank locus AY007311, SEQ ID NO: 68). Host plants are generated from transformed cells and are successfully selected for conferred resistance to bacterial wilt following inoculation with *Clavibacter michiganense michiganense.*

**Example 50. Corn is made resistant to Goss's bacterial wilt and blight (Clavibacter michiganense endo β-glucosidase gene**

Corn cells are transformed with the heterologous polynucleotide similar to pVZA100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to *Clavibacter michiganense* gene for endo β-glucosidase (GenBank locus X62582, SEQ ID NO: 69). Host plants are generated from transformed cells and are successfully selected for conferred resistance to Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt) following inoculation with *Clavibacter michiganense.*

**Example 51. A silencing construct method to protect soybeans against one or two fungal diseases**

A soybean host plant cell is transformed with either of the gene silencing constructs of Figure 10 and mature plants are generated therefrom. Mature plants are screened for

resistance to two major fungal diseases, namely soybean root and stem rot caused by *Phytophthora sojae* and Asian rust of soybean caused by *Phakopsora pachyrhizi*. Plants are identified that are resistant to each and to both of these two diseases. Those plants transformed with the upper construct are resistant to soybean root and stem rot. Those plants transformed with the middle construct are resistant to Asian rust of soybean. Those plants transformed with the lower construct are resistant to both soybean root and stem rot and Asian rust of soybean.

**Example 52. A polycistronic silencing construct method to protect soybeans against three fungal diseases**

A soybean host plant cell is transformed with a polycistronic gene silencing construct of Figure 9 and mature plants are generated therefrom. Mature plants are screened for resistance to three major fungal diseases, namely soybean root and stem rot caused by *Phytophthora sojae,* soybean sudden death syndrome caused by *Fusarium solani f. sp. glycines, and* Asian rust of soybean caused by *Phakopsora pachyrhizi*. Plants are identified that are resistant to each and all of these three diseases.

**Example 53. Depathogenesis of Phytophthora species by feeding on transgenic plants or by direct transformation with pVZA 100, pVZA300 or pVZA400**

Tobacco host cells were transformed with the silencing construct pVZA 100 (SEQ ID NO: 5) and plants were generated therefrom. Such transformed plants were highly resistant to *P. nicotianae*. Typical reactions by tobacco plants are shown in Figure 11. Plant A shows reactions typical of wild type tobacco plants or those transformed with pCAMBIA1201. The plants are susceptible, there are major stem lesions, and the root system is essentially destroyed. Such plants usually die 5-8 days after inoculation. Plant B is from Transgenic line 26 (see below). It is typical of those plants transformed with pVZA100. It is highly resistant to *P. nicotianae* and shows no symptoms other than small lesions on the tips of the upper roots. Such plants grow to maturity and set fertile seed.

When *P. nicotianae* was re-isolated from the restricted lesions on the resistant plant and re-tested on wild type plants, it was no longer pathogenic. Isolation of RNA from this fungus and hybridization with the radioactive cutinase probe as above in Example 14 indicates the presence of siRNAs for the cutinase gene in *P. nicotianae*, thereby explaining the loss of pathogenicity. In **Figure 12,** lane 1 again shows the 35 nt oligonucleotides VZA 3F (SEQ ID NO: 3) and VZA 4R (SEQ ID NO: 4) serving as the molecular size control, lane 2 shows the 620 nt messenger RNA from the wild type fungus, lane 3 shows the siRNAs from a silenced transgenic tobacco plant, and lane 4 shows the siRNAs from the nonpathogenic fungus isolated from the resistant transgenic tobacco.

As shown in Example 13, transforming species of a pest directly with silencing constructs or by feeding pest species on plants transformed with silencing constructs had major effects on the pathogenicity, growth and survival of the pest (in this example, the fungi). These results support directly or indirectly the utility of this embodiment of the present invention to minimize crop losses to pests and to enhance agricultural productivity.

**Example 54. Depathogenesis: Watermelon transformed with a cutinase silencing heterologous polynucleotide (F. oxysporum cutinase):**

In Florida and Georgia watermelons can be planted in a field for only one year. The farmer must then wait 6 or 7 years to use that field again because a single year of use results in the high build up of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum.* To use a field in successive years, the farmer must resort to expensive and severe annual treatments with methyl bromide or other potent chemicals.

Watermelons are regenerated from a host plant cell transformed with a heterologous polynucleotide similar to pVZA 100 (Example 3) except that the sense and antisense sequences correspond to the cutinase gene in *F. oxysporum.* *F. oxysporum* infects the watermelon and the *F. oxysporum* cutinase gene is silenced. Other watermelon species (not transformed according to the present invention) are planted within six feet of the regenerated (transgenic) watermelon. Such other watermelon species are infected by *F. oxysporum* to a lesser extent than would be predicted were it not for the cultivation of the regenerated (transgenic) watermelons adjacent to them.

**Example 55. Broad Based Plant Resistance and Depathogenesis with ribosomal RNA silencing heterologous polynucleotides:**

Optionally, to effectively implement depathogenesis, a broad-based or cross generic protection against several species of pathogenic fungi can be obtained. This can be accomplished by utilizing silencing constructs containing ribosomal DNA (rDNA) genes. The rDNA sequences of fungal pathogens are similar enough to function in the control of closely related fungal species, but are sufficiently dissimilar to permit differentiation among groups of fungi, thereby enabling the selective targeting of specific groups of fungal pathogens with single or multiple or polycistronic gene silencing constructs.

This approach is illustrated in Table 13. The 18S rDNA sequences of *Phytophthora sojae* and *Phakopsora pachyrhizi* were "blasted" against the data in the NCBI/NIH GenBank. The *Phytophthora sojae* sequence showed strong homology (100 to 93%) to the sequences of 16 additional closely related fungal species, but it did not show significant homology to that of *Phakopsora pachyrhizi.* Conversely, the 18S rDNA sequence of *Phakopsora pachyrhizi*

showed strong homology (100 to 93%) to the sequences of 19 additional closely related fungal species, but it did not show significant homology to that of *Phytophthora sojae*. Therefore, individual gene silencing constructs can be developed in accord with the teachings herein to control the group of fungi related to *Phytophthora sojae* or to *Phakopsora pachyrhizi*, or alternatively a polycistronic gene silencing construct can be developed to control both groups simultaneously.

**Table 13. GenBank sequences ribosomal DNA producing significant alignments with target species**

| *Phytophthora sojae* 18s ribosomal DNA The identities of the sequences ranges from 100 to 93% over 129 nucleotides. | | *Phakopsora pachyrhizi* 18s ribosomal DNA The identities of the sequences ranges from 100 to 93% over 89 nucleotides. | |
|---|---|---|---|
| **Fungus Species = (17)** | **(bits)** | **Fungus Species = (18)** | **(bits)** |
| *Phytophthora sojae* | 278 | *Phakopsora pachyrhizi* | 278 |
| *Phytophthora vignae* | 194 | *Phakopsora meibomiae* | 153 |
| *Phytophthora drechsleri* | 174 | *Uromyces aemulus* | 131 |
| *Phytophthora cinnamomi* | 174 | *Puccinia striiformis* | 123 |
| *Plasmopara viticola* | 168 | *Pandora neoaphidis* | 121 |
| *Phytophthora melonis* | 167 | *Puccinia allii* | 119 |
| *Phytophthora cryptogea* | 165 | *Piromyces sp.* | 119 |
| *Phytophthora pistaciae* | 161 | *Dioszegia sp.* | 117 |
| *Hyaloperonospora parasitica* | 161 | *Bullera sp. T* | 117 |
| *Phytophthora niederhauserii* | 161 | *Dioszegia crocea* | 117 |
| *Phytophthora sinensis* | 153 | *Cadophora sp.* | 117 |
| *Phytophthora cajani* | 153 | *Dioszegia hungarica* | 117 |
| *Pythium insidiosum* | 153 | *Phialophora sp.* | 117 |
| *Phytophthora palmivora* | 151 | *Anaeromyces sp.* | 117 |
| *Phytophthora ramorum* | 149 | *Phialophora melinii* | 117 |
| *Peronospora corydalis* | 149 | *Puccinia triticina* | 115 |
| *Pythium rostratum* | 141 | *Neocudoniella radicella* | 115 |
| | | *Pinctada nigra* | 115 |
| | | *Peziza vesiculosa* | 115 |
| | | *Phillipsia domingensis* | 115 |

**Example 56. Control of multiple plant pests using multiple silencing heterologous polynucleotides**

Plants are often attacked by a multiplicity of pests. Optionally, it may be useful to control several pests on the same plant. Methods for gene stacking to control multiple pests and the useful gene sequences (for example, genes encoding ribosomal RNAs, cutinases, cathepsins and other essential enzymes and proteins) are taught herein. A nonlimiting example is soybeans and the simultaneous control of *Phytophthora* root and stem rot, Asian rust, the

soybean cyst nematode, sudden death syndrome and aphids. Exemplary genes to stacked for this purpose include SEQ ID NO: 14 for *Phytophthora* root and stem rot, SEQ ID NO: 50 for Asian rust, SEQ ID NO: 62 for the soybean cyst nematode, SEQ ID NO: 48 for sudden death syndrome, and SEQ ID NO: 56 for aphids.

Similarly, corn can be made resistant to root and stalk rots, mycotoxins, leaf blights, stalk and ear borers, aphids and nematodes. Similarly, cotton can be made resistant to boll rot, *Verticillium* and *Fusarium* wilts, seedling blights, damping off, boll weevil, bollworms, aphids, and loopers. Similarly, canola can be made resistant to black leg, stem rot, black spot, damping off and seedling blights, flea beetles, weevils, and aphids.

Similarly, wheat can be made resistant to leaf and stem rust, head blight, *Septoria* blotches, take-all, smuts, powdery and downy mildew, aphids and nematodes. Similarly, tomato can be made resistant to late blight, anthracnose, gray mold, *Verticillium* wilt, nematodes, and aphids. Similarly, potato can be made resistant to late blight, early blight, *Verticillium* wilt, nematodes, Colorado potato beetle, and aphids.

All references cited herein are incorporated by reference herein for all that they teach and for all purposes, to the extent they are not inconsistent with the explicit teachings herein. It is to be understood that, while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of the following claims.

The Sequence Lisitngs are incorporated herein by reference.

# CLAIMS

I claim:

1. A method for conferring pest resistance to a plant comprising a step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) a first antisense sequence having homology to a first pest pathogenicity gene;

(b) a second antisense sequence having homology to a second pest pathogenicity gene;

(c) a first sense sequence substantially complementary to said first antisense sequence; and

(d) a second sense sequence substantially complementary to said second antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the first antisense sequence and the first sense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the second antisense sequence and the second sense sequence, and

wherein said first and second sense sequences and first and second antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length.

2. The method of Claim 1 wherein said plant is resistant to at least one pest selected from the group consisting of an insect, a bacterium, a fungus, and a nematode as compared to substantially the same plant lacking the heterologous polynucleotide.

3. The method of Claim 1 wherein said plant is resistant to at least two pests wherein each of said two pests belongs to a different member selected from the group consisting of an insect, a bacterium, a fungus, and a nematode.

4. The method of Claim 1 wherein said plant is resistant to at least two pests wherein each of said at least two pests belongs to different subspecies of the same member selected from the group consisting of an insect, a bacterium, a fungus, and a nematode.

5. The method of Claim 1 wherein said plant is resistant to at least two pests wherein each of said at least two pests belongs to different species of the same member selected from the group consisting of an insect, a bacterium, a fungus, and a nematode.

6. The method of Claim 1 wherein said plant is resistant to at least two pests wherein each of said at least two pests belongs to different genera of the same member selected from the group consisting of an insect, a bacterium, a fungus, and a nematode.

7. The method of Claim 1 wherein said plant is resistant at least two pests wherein each of said at least two pests belongs to different families of the same member selected from the group consisting of an insect, a bacterium, a fungus, and a nematode.

8. The method of Claim 1 wherein said plant is resistant to at least two pests wherein each of said at least two pests belongs to different orders of the same member selected from the group consisting of an insect, a bacterium, a fungus, and a nematode.

9. A method of conferring pest resistance to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising :

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene, and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence;

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence;

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length; and

wherein the antisense sequence is homologous to the pathogenicity gene of at least two pests from different species whereby the plant is resistant to said two pests as compared to substantially the same plant lacking the heterologous polynucleotide.

10. The method of Claim 9 wherein said at least two pests are selected from the group consisting of insects, bacteria, fungi, and nematodes.

11. The method of Claim 9 wherein said at least two pests are from two different subspecies.

12 The method of Claim 9 wherein said at least two pests are from two different species.

13. The method of Claim 9 wherein said at least two pests are from two different genera.

14. The method of Claim 9 wherein said at least two pests are from two different families.

15. The method of Claim 9 wherein said at least two pests are from two different orders.

16. A method for conferring pest resistance to a plant comprising a step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising :

(a) a first promoter operably linked to an antisense sequence wherein said antisense sequence is homologous to a pest pathogenicity gene and operably linked to a terminator;

(b) a second promoter operably linked to a sense sequence wherein said sense sequence is substantially complementary to said antisense sequence and operably linked to a terminator,

wherein said second promoter is a strong promoter relative to the first promoter,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region between sequences encoded by the antisense sequence and the sense sequence, and

wherein said first and second sense and first and second antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length.

17. A method for conferring pest resistance to a plant comprising a step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence homologous to a pest pathogenicity gene;

(b) a first sense sequence substantially complementary to said antisense sequence, and

(c) a second sense sequence substantially complementary to said antisense sequence, and

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region between sequences encoded by the antisense sequence and the first sense sequence,

wherein said first and second sense sequences and the antisense sequence are each at least about 19 nucleotides in length.

18. A method of conferring pest resistance to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene; and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length and comprise a duplicate portion of said pest pathogenicity gene.

19. A method of conferring pest resistance to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene, and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length,

wherein said pest pathogenicity gene is selected from the group consisting of cutinases, kinases, ribosomal RNAs, adhesins, elicitins, and G-proteins; and

wherein said pest is a fungus.

20. A method of conferring pest resistance to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene;

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence; and

(c) at least two promoters functional in the plant in orientation relative to the sense and antisense sequences such that the sense and antisense sequences are transcribed into separate transcripts,

wherein said separate transcripts are capable of hybridizing to form a double-stranded region,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length, and

wherein said pest is a fungus.

21. A method of conferring pest resistance to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene; and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length,

wherein said pest pathogenicity gene is selected from the group consisting of Kinases, ribosomal RNAs, G-proteins, moulting factors, serine proteases, cysteine proteases, and juvenile hormone esterases; and

wherein said pest is an insect.

22. A method of conferring pest resistance to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene;

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence; and

(c) at least two promoters functional in the plant in orientation relative to the sense and antisense sequences such that the sense and antisense sequences are transcribed into separate transcripts,

wherein said separate transcripts are capable of hybridizing to form a double-stranded region,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length, and

wherein said pest is an insect.

23. A method of conferring pest resistance to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene; and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length;

wherein said pest pathogenicity gene is selected from the group consisting of kinases, ribosomal RNAs, G-proteins, cuticle collagen proteins, and cathepsin proteases, and

wherein said pest is a nematode.

24. A method of conferring pest resistance to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene; and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length,

wherein said pest pathogenicity gene is selected from the group consisting of cutinases, mascerating enzymes, kinases, ribosomal RNAs, adhesins, and G-proteins; and

wherein said pest is a bacterium.

25. A method of conferring pest resistance to a plant comprising the step of transforming a host plant cell with a heterologous polynucleotide, said heterologous polynucleotide comprising:

(a) an antisense sequence having homology to a pest pathogenicity gene; and

(b) a sense sequence substantially complementary to said antisense sequence,

wherein a transcript of the heterologous polynucleotide is capable of hybridizing to form a double-stranded region comprising nucleotides encoded by the antisense sequence and the sense sequence,

(c) at least two promoters functional in the plant in orientation relative to the sense and antisense sequences such that the sense and antisense sequences are transcribed into separate transcripts,

wherein said sense and antisense sequences are each at least about 19 nucleotides in length, and

wherein said pest is a bacterium.

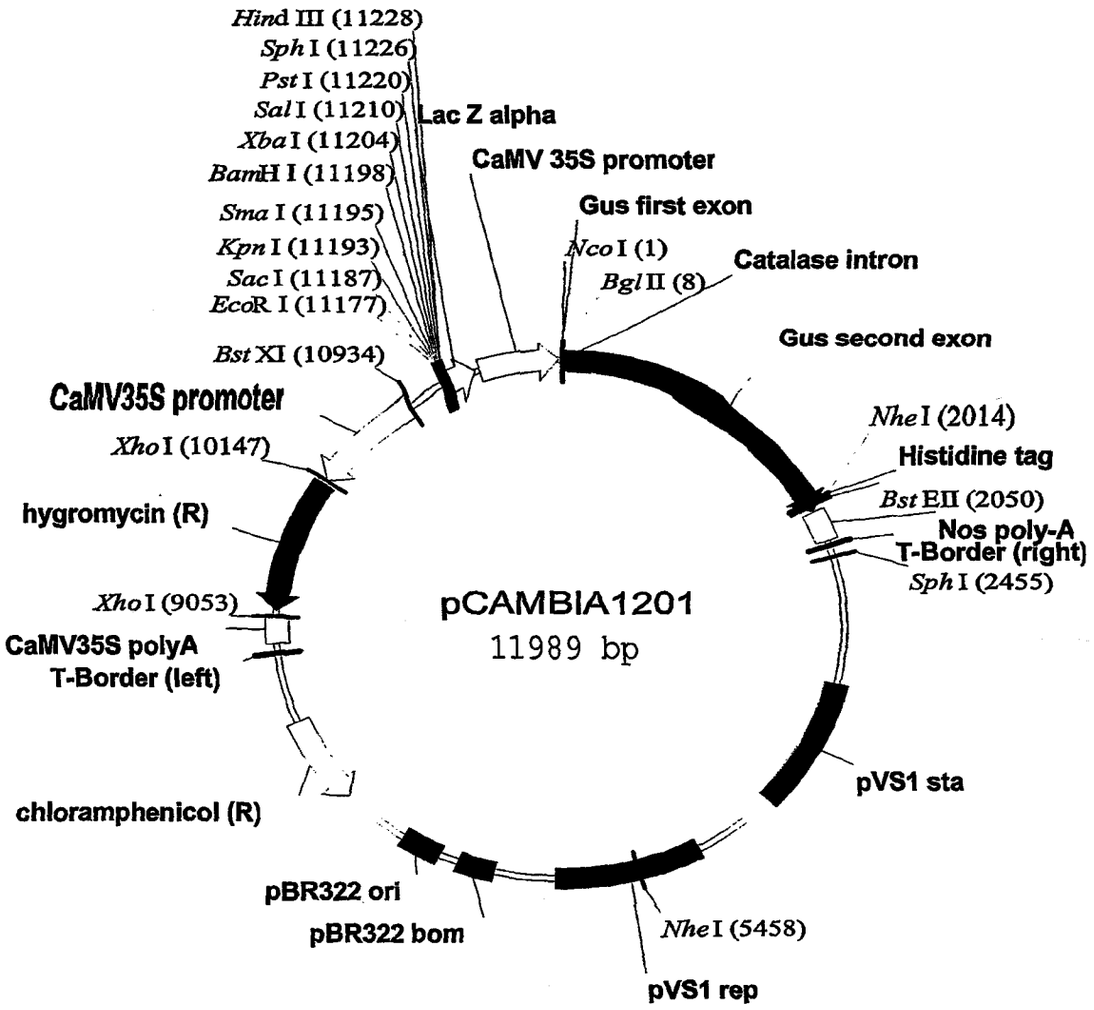
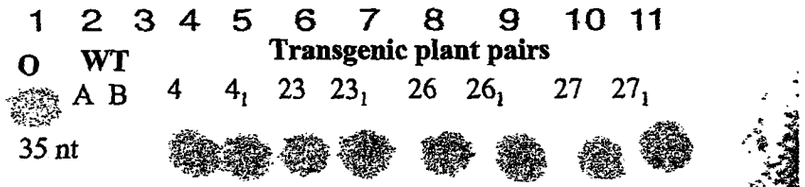


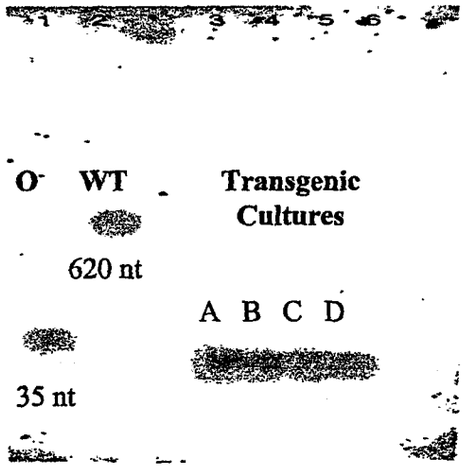

FIG 1

WO 2006/047495
1/14
PCT/US2005/038330




**Tobacco plants**

FIG 4A




***Phytophthora nicotianae***

FIG 4B

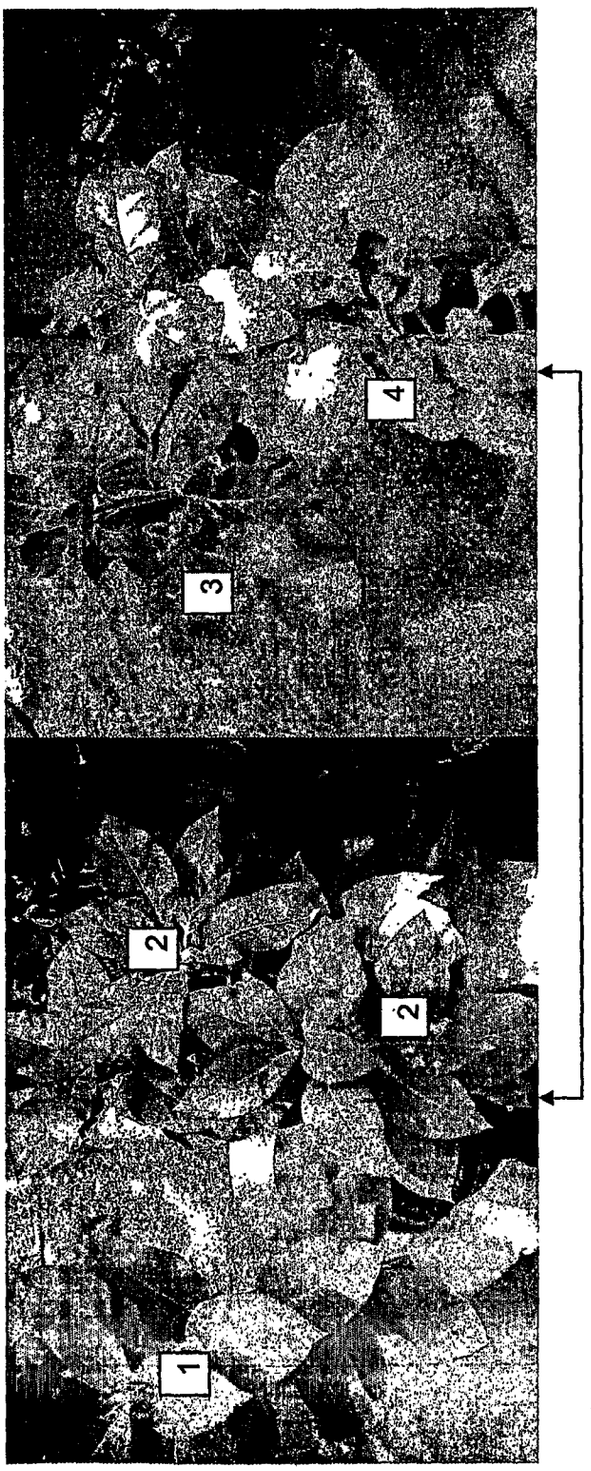



FIG 5



FIG 6B



FIG 6D

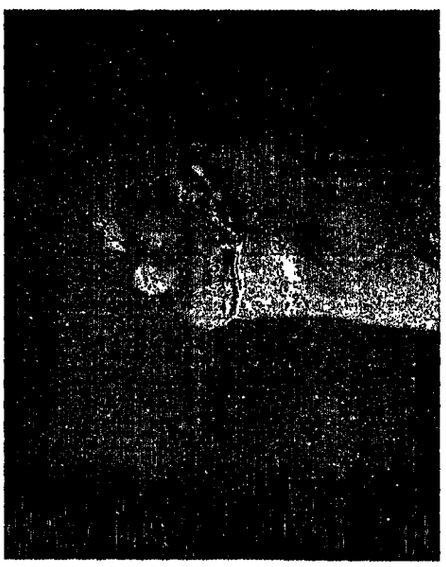


FIG 6A



FIG 6C

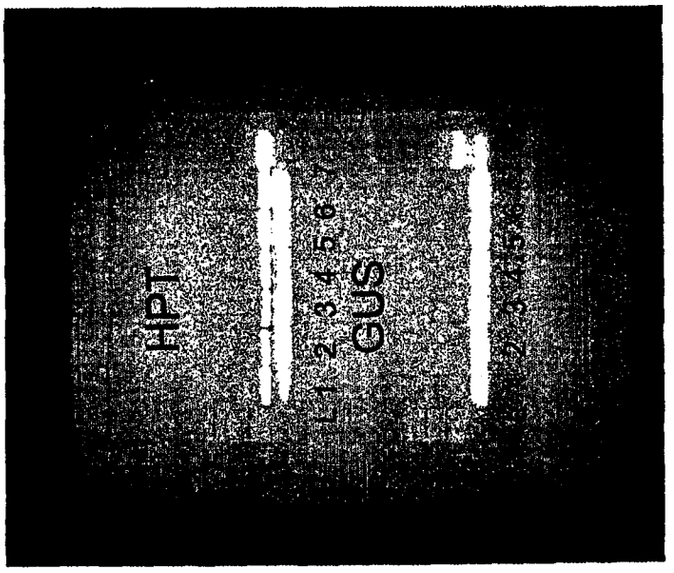



FIG 7B

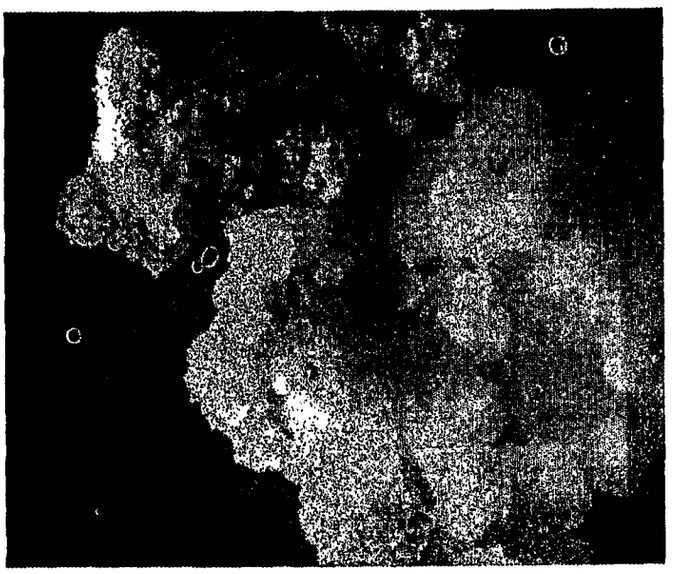


FIG 7A

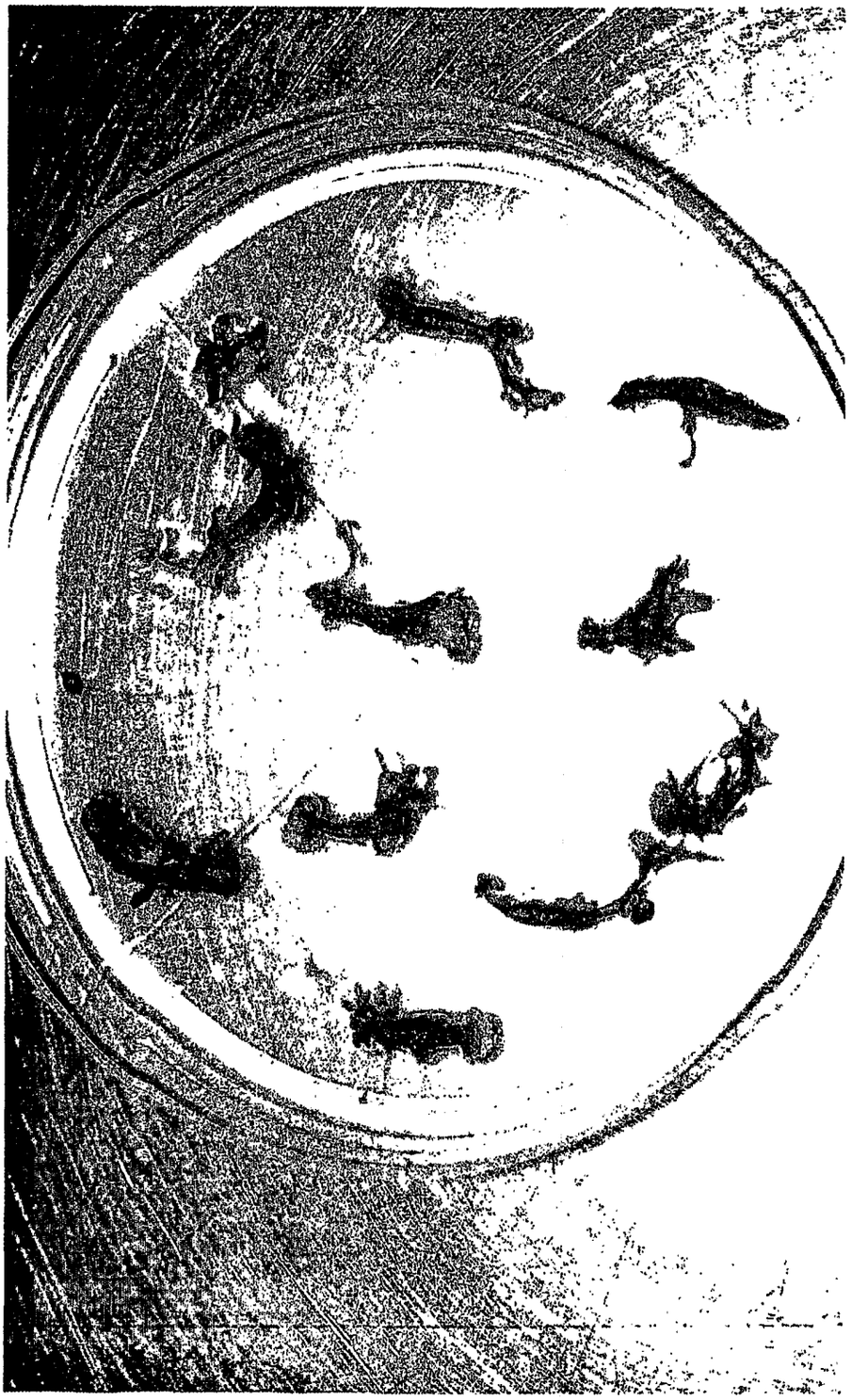


FIG 8

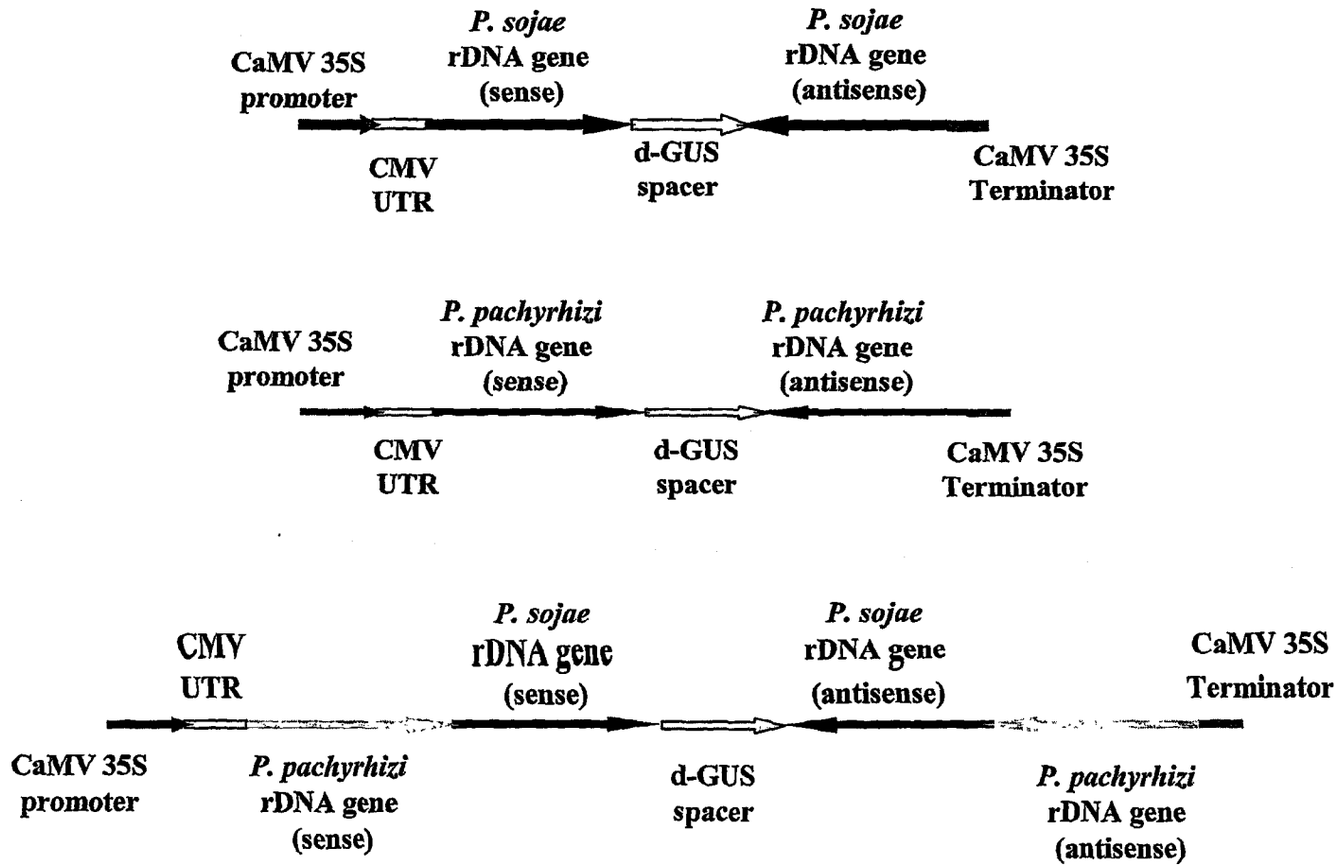

CaMV 35S promoter
P. sojae rDNA gene (sense)
P. sojae rDNA gene (antisense)
CMV UTR
d-GUS spacer
CaMV 35S Terminator
CaMV 35S promoter
P. pachyrhizi rDNA gene (sense)
P. pachyrhizi rDNA gene (antisense)
CMV UTR
d-GUS spacer
CaMV 35S Terminator
CMV UTR
P. sojae rDNA gene (sense)
P. sojae rDNA gene (antisense)
CaMV 35S Terminator
CaMV 35S promoter
P. pachyrhizi rDNA gene (sense)
d-GUS spacer
P. pachyrhizi rDNA gene (antisense)

FIG 10




FIG 11

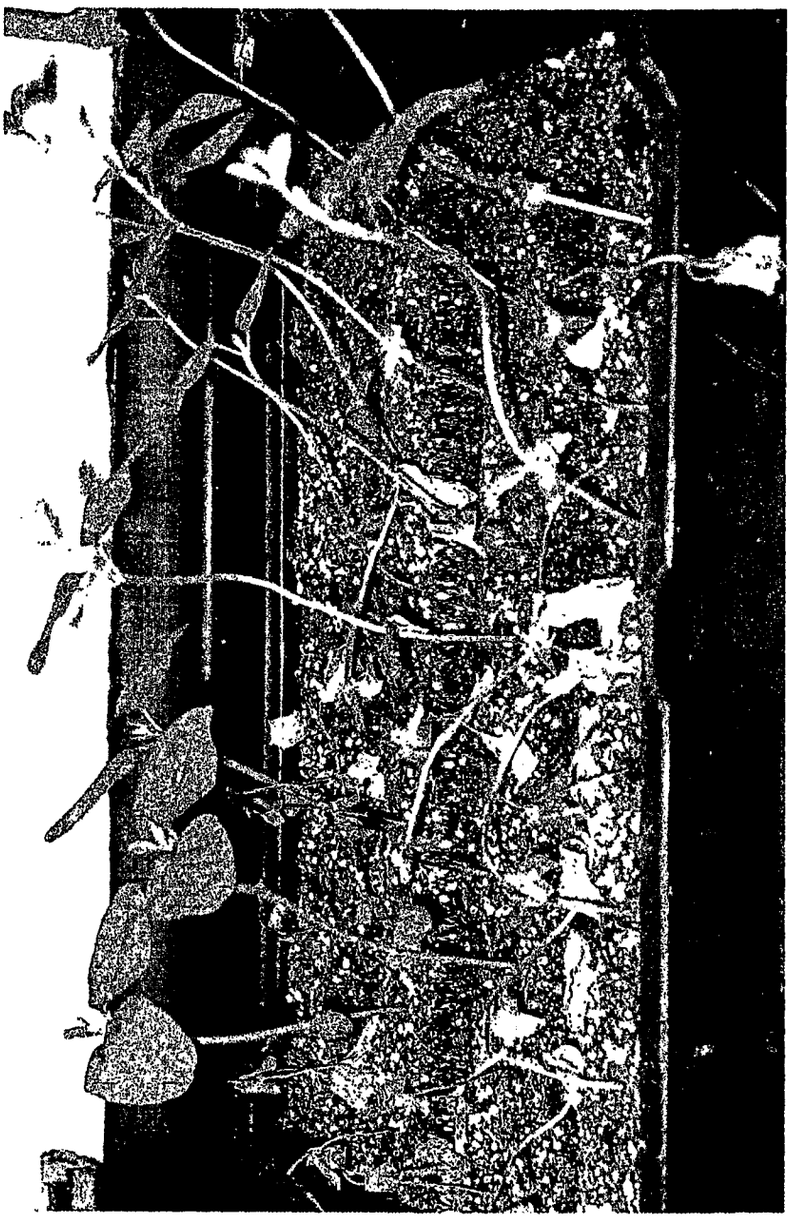


FIG 13

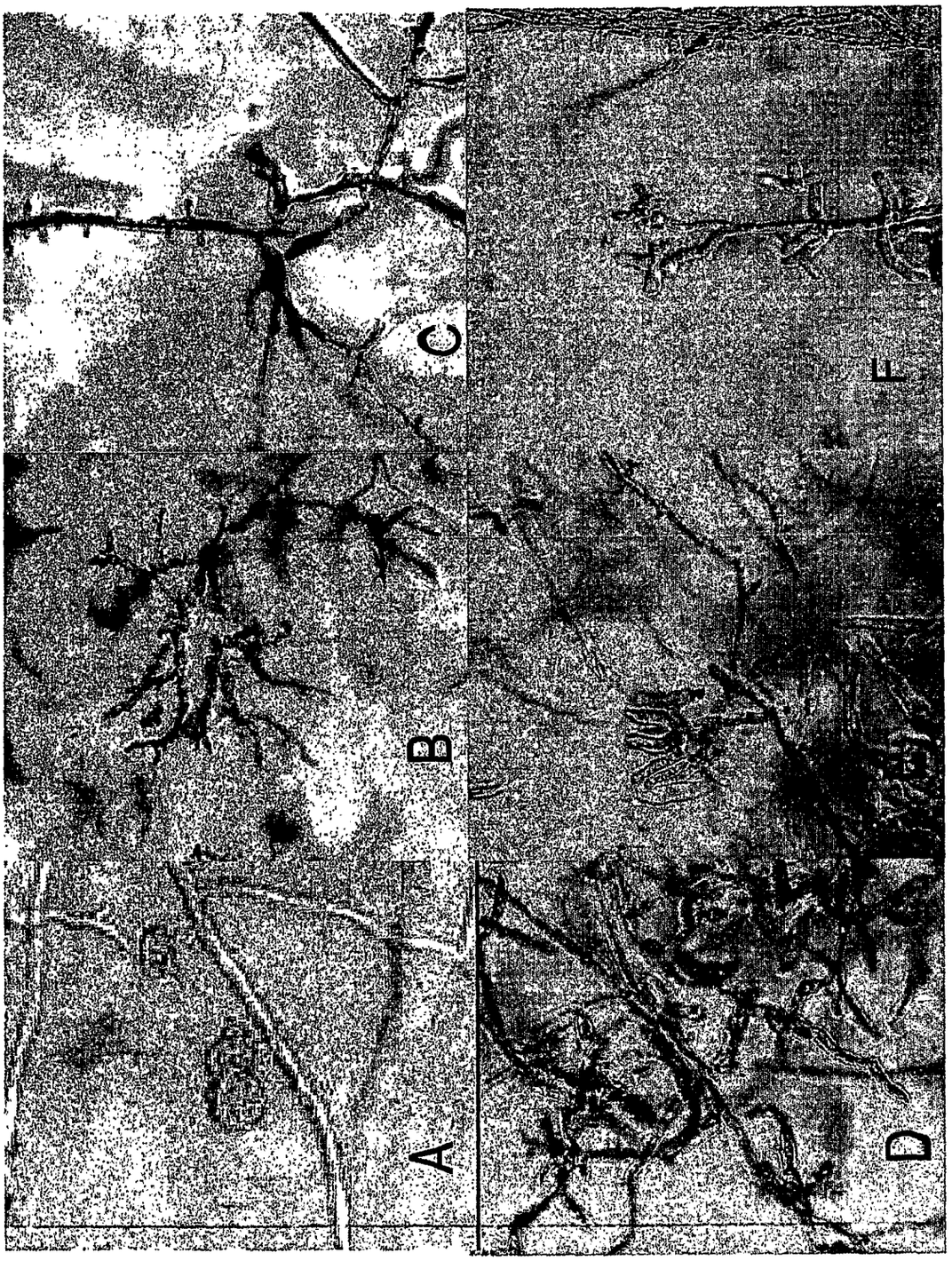



Figure 14

122
122

SEQUENCE LISTING

<110> Niblett, Charles L.

<120> Methods and Materials for Conferring Resistance to Pests and Pathogens of Plants

<130> VEN-100CXCZ1 PCT

<160> 69

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer VZA 1F

<400> 1
taaattagcg gccgcatgaa attcttcgct cgcagtag 38

<210> 2
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer VZA 2R

<400> 2
aaaaatccat ggtcaagcag aaccacggct tagtg 35

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer VZA 3F

<400> 3
aaataagggc ccatgaaatt cttcgctcgc agt 33

<210> 4
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer VZA 4R

<400> 4
aaatatctcg agtcaagcag aaccacggct tagtg 35

123
+23

<210> 5
<211> 2201
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> pVZA100 silencing construct

<400> 5
gggcccatga aattcttcgc tcgcagtaga tggcactcca gtcgttgccg tgtcgtcacg 60

gctcgcctac gatccgatta accgcagaca caccgattgt gcctgattca gagaggctcc 120

cactgaaacg agatgagcct ggctcacggt cgatgcgcag caccttcata ccatcttcac 180

aatgctcgaa cttgtcttcg gcaacggctt cgtcatcgcg tcggcgatca tgtcgtcggt 240

accaacatgg cgaagccgtt gcctcgtcct ccactaggtg gcgcaccaag tggaacttgt 300

tcataatatg cttgctcttg ctgtgcttgc caggcttggc agttagatac atgcacgaca 360

tgttttcgcc gtgtatctcc ggagtcgcaa actcccagca tagttcgtca cagagtccac 420

gtagccactg tagatctctg gtaccttcat tcatagcaat atactctgct tccgttgtgc 480

tctgtgcgtt gatctcttgc tttcttgatc cgtacgaaac cacattgcca ttgacgaacg 540

tgacgaactg cctaacactc tttcggtcat cagggtcatt gcgtagtgag catcggtgta 600

gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggcaac aattgtccat cactagccgt ggttctgctt 660

gacactaagc cgtggttctg cttgactcga ggtagatctg agggtaaatt tctagttttt 720

ctccttcatt ttcttggtta ggaccctttt ctcttttttat ttttttgagc tttgatcttt 780

ctttaaactg atctattttt taattgattg gttatggtgt aaatattaca tagctttaac 840

tgataatctg attactttat ttcgtgtgtc tatgatgatg atgatagtta cagaaccgac 900

gactcgtccg tcctgtagaa accccaaccc gtgaaatcaa aaaactcgac ggcctgtggg 960

cattcagtct ggatcgcgaa aactgtggaa ttgatcagcg ttggtgggaa agcgcgttac 1020

aagaaagccg ggcaattgct gtgccaggca gttttaacga tcagttcgcc gatgcagata 1080

ttcgtaatta tgcgggcaac gtctggtatc agcgcgaagt ctttataccg aaaggttggg 1140

caggccagcg tatcgtgctg cgtttcgatg cggtcactca ttacggcaaa gtgtgggtca 1200

ataatcagga agtgatggag catcagggcg gctatacgcc atttgaagcc gatgtcacgc 1260

cgtatgttat tgccgggaaa agtgtacgta tcaccgtttg tgtgaacaac gaactgaact 1320

ggcagactat cccgccggga atggtgatta ccgacgaaaa cggcaagaaa aagcagtctt 1380

acttccatga tttctttaac tatgccggaa tccatcgcag cgtaatgctc tacaccacgc 1440

cgaacacctg ggtggacgat atcaccgtgg tgacgcatgt cgcgcaagac tgtaaccacg 1500

cgtctgttcc atggtcaagc agaaccacgg cttagtgtca agcagaacca cggctagtga 1560

124
124

tggacaattg ttgccgggaa cgacgtgaat ctgacgtgct acaccgatgc tcactacgca 1620

atgaccctga tgaccgaaag agtgttaggc agttcgtcac gttcgtcaat ggcaatgtgg 1680

tttcgtacgg atcaagaaag caagagatca acgcacagag cacaacggaa gcagagtata 1740

ttgctatgaa tgaaggtacc agagatctac agtggctacg tggactctgt gacgaactat 1800

gctgggagtt tgcgactccg gagatacacg gcgaaaacat gtcgtgcatg tatctaactg 1860

ccaagcctgg caagcacagc aagagcaagc atattatgaa caagttccac ttggtgcgcc 1920

acctagtgga ggacgaggca acggcttcgc catgttggta ccgacgacat gatcgccgac 1980

gcgatgacga agccgttgcc gaagacaagt tcgagcattg tgaagatggt atgaaggtgc 2040

tgcgcatcga ccgtgagcca ggctcatctc gtttcagtgg gagcctctct gaatcaggca 2100

caatcggtgt gtctgcggtt aatcggatcg taggcgagcc gtgacgacac ggcaacgact 2160

ggagtgccat ctactgcgag cgaagaattt catgcggccg c 2201

<210> 6
<211> 2031
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> pVZA200 Silencing construct

<400> 6
gggcccacaa gagcgaagat gcagagtacg acaacacata cattccaagg ttctttgacg 60

ctaggagaaa atggagacat tgtagtacga tcggaagagt ccgtgaccaa ggaaactgtg 120

gatcttgttg ggctgtggcc actagctcgg ctttcgctga ccgtttgtgt gtagcaacaa 180

atgcagactt caacgaatta ttatccgccg aagaaatcac tttctgctgt catacatgtg 240

gcttcggatg caacggtggt tacccgatta aagcatggaa acgttttagt aaaaaaggtt 300

tagtcaccgg aggagactac aaatctggag agggttgtga accatacaga gttccacctt 360

gtcctaatga cgaccaagga aataatacat gcgccggtaa accaatggaa tcaaaccaca 420

ggtgtaccag gatgtgctac ggtgaccagg acctcgactt cgacgaagac cacagataca 480

cacgtgatta ctactaccta acatacggta gcatccaaaa ggacgtcatg acttacggac 540

caattgaagc atcgttcgat gtatacgacg atttccccag ttacaagtca ggcgtttacg 600

tgaaatgtag atctgagggt aaatttctag tttttctcct tcattttctt ggttaggacc 660

cttttctctt tttatttttt tgagctttga tctttcttta aactgatcta ttttttaatt 720

gattggttat ggtgtaaata ttacatagct ttaactgata atctgattac tttatttcgt 780

gtgtctatga tgatgatgat agttacagaa ccgacgactc gtccgtcctg tagaaacccc 840

aacccgtgaa atcaaaaaac tcgacggcct gtgggcattc agtctggatc gcgaaaactg 900

125
125

tggaattgat cagcgttggt gggaaagcgc gttacaagaa agccgggcaa ttgctgtgcc 960

aggcagtttt aacgatcagt tcgccgatgc agatattcgt aattatgcgg gcaacgtctg 1020

gtatcagcgc gaagtcttta taccgaaagg ttgggcaggc cagcgtatcg tgctgcgttt 1080

cgatgcggtc actcattacg gcaaagtgtg ggtcaataat caggaagtga tggagcatca 1140

gggcggctat acgccatttg aagccgatgt cacgccgtat gttattgccg gcgaaaagtgt 1200

acgtatcacc gtttgtgtga acaacgaact gaactggcag actatcccgc cgggaatggt 1260

gattaccgac gaaaacggca agaaaaagca gtcttacttc catgatttct ttaactatgc 1320

cggaatccat cgcagcgtaa tgctctacac cacgccgaac acctgggtgg acctcgagac 1380

cgtggtgacg catgtcgcgc aagactgtaa ccacgcgtct gttatttcac gtaaacgcct 1440

gacttgtaac tggggaaatc gtcgtataca tcgaacgatg cttcaattgg tccgtaagtc 1500

atgacgtcct tttggatgct accgtatgtt aggtagtagt aatcacgtgt gtatctgtgg 1560

tcttcgtcga agtcgaggtc ctggtcaccg tagcacatcc tggtacacct gtggtttgat 1620

tccattggtt taccggcgca tgtattattt ccttggtcgt cattaggaca aggtggaact 1680

ctgtatggtt cacaaccctc tccagatttg tagtctcctc cggtgactaa acctttttta 1740

ctaaaacgtt tccatgcttt aatcgggtaa ccaccgttgc atccgaagcc acatgtatga 1800

cagcagaaag tgatttcttc ggcggataat aattcgttga agtctgcatt tgttgctaca 1860

cacaaacggt cagcgaaagc cgagctagtg gccacagccc aacaagatcc acagtttcct 1920

tggtcacgga ctcttccgat cgtactacaa tgtctccatt ttctcctagc gtcaaagaac 1980

cttggaatgt atgtgttgtc gtactctgca tcttcgctct tgtgcggccg c 2031

<210> 7
<211> 3159
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> pVZA300 Silencing construct

<400> 7
gggcccgccc tcgtcggctc cacttccgcc accacgtgca ccacctcgca gcagaccgta 60

gcgtacgtgg cgctcgtaag catcctctcg gacacgtcgt ttaatcagtg ctcgacggac 120

tccggctact cgatgctgac ggccacctcg ctgcccacga cggagcagta caagctcatg 180

tgcgcgtcga cggcgtgcaa gacgatgatc aacaagatcg tgtcgctcaa cgctcccgac 240

tgcgagctga cggtgccaac tagtggcctg gtactcaacg tgttcacagc cctcgtcggc 300

tccacttccg ccaccacgtg caccacctcg cagcagaccg tagcgtacgt ggcgctcgta 360

126
126

agcatcctct cggacacgtc gtttaatcag tgctcgacgg actccggcta ctcgatgctg 420

acggccacct cgctgcccac gacggagcag tacaagctca tgtgcgcgtc gacggcgtgc 480

aagacgatga tcaacaagat cgtgtcgctc aacgctcccg actgcgagct gacggtgcca 540

actagtggcc tggtactcaa cgtgttcaca acaagagcga agatgcagag tacgacaaca 600

catacattcc aaggttcttt gacgctagga gaaaatggag acattgtagt acgatcggaa 660

gagtccgtga ccaaggaaac tgtggatctt gttgggctgt ggccactagc tcggctttcg 720

ctgaccgttt gtgtgtagca acaaatgcag acttcaacga attattatcc gccgaagaaa 780

tcactttctg ctgtcataca tgtggcttcg gatgcaacgg tggttacccg attaaagcat 840

ggaaacgttt tagtaaaaaa ggtttagtca ccggaggaga ctacaaatct ggagagggtt 900

gtgaaccata cagagttcca ccttgtccta atgacgacca aggaaataat acatgcgccg 960

gtaaaccaat ggaatcaaac cacaggtgta ccaggatgtg ctacggtgac caggacctcg 1020

acttcgacga agaccacaga tacacacgtg attactacta cctaacatac ggtagcatcc 1080

aaaaggacgt catgacttac ggaccaattg aagcatcgtt cgatgtatac gacgatttcc 1140

ccagttacaa gtcaggcgtt tacgtgaaat gtagatctga gggtaaattt ctagttttc 1200

tccttcattt tcttggttag gacccttttc tcttttttatt tttttgagct ttgatctttc 1260

tttaaactga tctatttttt aattgattgg ttatggtgta aatattacat agctttaact 1320

gataatctga ttactttatt tcgtgtgtct atgatgatga tgatagttac agaaccgacg 1380

actcgtccgt cctgtagaaa ccccaacccg tgaaatcaaa aaactcgacg gcctgtgggc 1440

attcagtctg gatcgcgaaa actgtggaat tgatcagcgt tggtgggaaa gcgcgttaca 1500

agaaagccgg gcaattgctg tgccaggcag ttttaacgat cagttcgccg atgcagatat 1560

tcgtaattat gcgggcaacg tctggtatca gcgcgaagtc tttataccga aaggttgggc 1620

aggccagcgt atcgtgctgc gtttcgatgc ggtcactcat tacggcaaag tgtgggtcaa 1680

taatcaggaa gtgatggagc atcagggcgg ctatacgcca tttgaagccg atgtcacgcc 1740

gtatgttatt gccgggaaaa gtgtacgtat caccgtttgt gtgaacaacg aactgaactg 1800

gcagactatc ccgccgggaa tggtgattac cgacgaaaac ggcaagaaaa agcagtctta 1860

cttccatgat ttctttaact atgccggaat ccatcgcagc gtaatgctct acaccacgcc 1920

gaacacctgg gtggacctcg agaccgtggt gacgcatgtc gcgcaagact gtaaccacgc 1980

gtctgttatt tcacgtaaac gcctgacttg taactgggga aatcgtcgta tacatcgaac 2040

gatgcttcaa ttggtccgta agtcatgacg tcctttttgga tgctaccgta tgttaggtag 2100

tagtaatcac gtgtgtatct gtggtcttcg tcgaagtcga ggtcctggtc accgtagcac 2160

atcctggtac acctgtggtt tgattccatt ggttttaccgg cgcatgtatt atttccttgg 2220

tcgtcattag gacaaggtgg aactctgtat ggttcacaac cctctccaga tttgtagtct 2280

cctccggtga ctaaaccttt tttactaaaa cgttttccatg ctttaatcgg gtaaccaccg 2340

ttgcatccga agccacatgt atgacagcag aaagtgattt cttcggcgga taataattcg 2400

ttgaagtctg catttgttgc tacacacaaa cggtcagcga aagccgagct agtggccaca 2460

gcccaacaag atccacagtt tccttggtca cggactcttc cgatcgtact acaatgtctc 2520

cattttctcc tagcgtcaaa gaaccttgga atgtatgtgt tgtcgtactc tgcatcttcg 2580

ctcttgttgt gaacacgttg agtaccaggc cactagttgg caccgtcagc tcgcagtcgg 2640

gagcgttgag cgacacgatc ttgttgatca tcgtcttgca cgccgtcgac gcgcacatga 2700

gcttgtactg ctccgtcgtg ggcagcgagg tggccgtcag catcgagtag ccggagtccg 2760

tcgagcactg attaaacgac gtgtccgaga ggatgcttac gagcgccacg tacgctacgg 2820

tctgctgcga ggtggtgcac gtggtggcgg aagtggagcc gacgagggct gtgaacacgt 2880

tgagtaccag gccactagtt ggcaccgtca gctcgcagtc gggagcgttg agcgacacga 2940

tcttgttgat catcgtcttg cacgccgtcg acgcgcacat gagcttgtac tgctccgtcg 3000

tgggcagcga ggtggccgtc agcatcgagt agccggagtc cgtcgagcac tgattaaacg 3060

acgtgtccga gaggatgctt acgagcgcca cgtacgctac ggtctgctgc gaggtggtgc 3120

acgtggtggc ggaagtggag ccgacgaggg cgcggccgc 3159

<210> 8
<211> 2031
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> pVZA400 silencing construct

<400> 8
gggccctttc cgtaggtgaa cctgcggaag gatcattacc acacctaaaa actttccacg 60

tgaaccgttt caacccaata gttgggggtc ttacttggcg gcggctgctg gctttattgc 120

tggcggctac tgctgggcga gccctatcaa aaggcgagcg tttggacttc ggtctgagct 180

agtagctttt ttattttaaa ccctttactt aatactgatt atactgtggg gacgaaagtc 240

tctgctttta actagatagc aactttcagc agtggatgtc taggctcgca catcgatgaa 300

gaacgctgcg aactgcgata cgtaatgcga attgcaggat tcagtgagtc atcgaaattt 360

tgaacgcata ttgcacttcc gggttagtcc tggaagtatg cctgtatcag tgtccgtaca 420

acaaacttgg ctttcttcct tccgtgtagt cggtggagga gatgccagat gtgaagtgtc 480

ttgcggttgg ttttcggacc gactgcgagt ccttttaaat gtactaaact gtacttctct 540

128
+28

ttgctccaaa agtggtggca ttgctggttg tggacgctgc tattgtagcg agttggcgac 600

cggtttgtag atctgagggt aaatttctag tttttctcct tcattttctt ggttaggacc 660

cttttctctt tttatttttt tgagctttga tctttcttta aactgatcta ttttttaatt 720

gattggttat ggtgtaaata ttacatagct ttaactgata atctgattac tttatttcgt 780

gtgtctatga tgatgatgat agttacagaa ccgacgactc gtccgtcctg tagaaacccc 840

aacccgtgaa atcaaaaaac tcgacggcct gtgggcattc agtctggatc gcgaaaactg 900

tggaattgat cagcgttggt gggaaagcgc gttacaagaa agccgggcaa ttgctgtgcc 960

aggcagtttt aacgatcagt tcgccgatgc agatattcgt aattatgcgg gcaacgtctg 1020

gtatcagcgc gaagtcttta taccgaaagg ttgggcaggc cagcgtatcg tgctgcgttt 1080

cgatgcggtc actcattacg gcaaagtgtg ggtcaataat caggaagtga tggagcatca 1140

gggcggctat acgccatttg aagccgatgt cacgccgtat gttattgccg ggaaaagtgt 1200

acgtatcacc gtttgtgtga acaacgaact gaactggcag actatcccgc cgggaatggt 1260

gattaccgac gaaaacggca agaaaaagca gtcttacttc catgatttct ttaactatgc 1320

cggaatccat cgcagcgtaa tgctctacac cacgccgaac acctgggtgg acctcgagac 1380

cgtggtgacg catgtcgcgc aagactgtaa ccacgcgtct gttaaaccgg tcgccaactc 1440

gctacaatag cagcgtccac aaccagcaat gccaccactt ttggagcaaa gagaagtaca 1500

gtttagtaca tttaaaagga ctcgcagtcg gtccgaaaac caaccgcaag acacttcaca 1560

tctggcatct cctccaccga ctacacggaa ggaagaaagc caagtttgtt gtacggacac 1620

tgatacaggc atacttccag gactaacccg gaagtgcaat atgcgttcaa aatttcgatg 1680

actcactgaa tcctgcaatt cgcattacgt atcgcagttc gcagcgttct tcatcgatgt 1740

gcgagcctag acatccactg ctgaaagttg ctatctagtt aaaagcagag actttcgtcc 1800

ccacagtata atcagtatta agtaaagggt ttaaaataaa aaagctacta gctcagaccg 1860

aagtccaaac gctcgccttt tgatagggct cgcccagcag tagccgccag caataaagcc 1920

agcagccgcc gccaagtaag acccccaact attgggttga aacggttcac gtggaaagtt 1980

tttaggtgtg gtaatgatcc ttccgcaggt tcacctacgg aaagcggccg c 2031

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer GUS forward

<400> 9
ggtgggaaag cgcgttacaa gaaagc 26

129
129

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer GUS reverse

<400> 10
gtttacgcgt tgcttccgcc actgg 25

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Hygromycin PT FP

<400> 11
cgtctgtcga gaagtttctg atcga 25

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Hygromycin PT RP

<400> 12
tacttctaca cagccatcgg tccaga 26

<210> 13
<211> 440
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora nicotianae (VZA 1 65R = Pnic Ri)

<400> 13
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatgtgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gtcaggtaga tgcacgacat gttatcaccg aatatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgtcgtgct ctgtgcgttg atcttcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acgttaccat tgacgaacgt cacgaaccca ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

130
130

gcgtagtcag catcggtgta 440

<210> 14
<211> 452
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora nicotianae (VZA 2 69F = Pnic 21)

<400> 14
accatctcga caatgcctcg aacttgtcct tcggcaacgg cttcgtcatc gcgtcggcga 60

tcatgtcgtc ggtaccaaca tggcgaatcc gtagctgctc gtcctccact aggtggcgca 120

ccaagtggaa cttgttcata atatgcttgc tcttgctgtg cttgccaggc ttggcagtta 180

gatagatgca cgacatgtta tcgccgagta tctccggagt cgcaaactcc cagcatagtt 240

cgtcacagag tccacgtagc cactgtagat ctctggtacc ttcattcata gcaatatact 300

ctgcttccgt tgtgctctgt gcgttgatct cttgctttct tgatccgtac gaaaccacat 360

tgccattgac gaacgtcacg aacccgctaa cactctttcg gtcatcaggg tcattagcgt 420

agtcagcatc ggtgtagcac gtcagattca cg 452

<210> 15
<211> 388
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora nicotianae (VZA 3 73F = Pnic 23)

<400> 15
tcataccatc tcgacaatgc tcaaacttgt ccttcggcaa cggcttcatc atcgcgtcgg 60

ctatcatgtc gtcggtgcca acatggcgaa tccgtagctg ctcgtcctcc actaggtggc 120

gcaccaagtg aaacttgttc ataatgtgct tgctcttgct gtgcttgcca ggcttggcag 180

tcaggtagat gcacgacttg ttatcgccga gtatctccgg agtcgcaaac tcccagcata 240

gttcttcaca gagtccacgt agccactgta gatatctggt accttcattc atagcaatat 300

actctgcttc cgttgtactc tgtacgttga tctcttgctt ccttgatccg tacgaaacca 360

cattgccatt gacgaacgtc acgaaccc 388

<210> 16
<211> 467
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora nicotianae (VZA 3 73F = Pnic 23)

131
131

<400> 16
tcataccatc acgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggg 467

<210> 17
<211> 465
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora nicotianae (VZA 1 65R = Pnic Ri)

<400> 17
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccg 465

<210> 18
<211> 395
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora capsici (VZA 6 70F = Pcap 30)

<400> 18
ccatctcgac aatgcctcga acttgtcctt cggcaacggc ttcgtcatcg cgtcggcgat 60

catgtcgtcg gtaccaacat ggctaatccg tagctgctcg tcctccacta ggtggcgcac 120

caagtggaac ttgttcataa tatgcttgct cttgctgtgc ttgccaggct tggcagttag 180

atagatgcac gacatgttat cgccgagtat ctccggagtc gcaaactccc agcatagttc 240

132
132

gtcacagagt ccacgtagcc actgtagatc tctggtacct tcattcatag caatatactc 300

tgcttccgtt gtgctctgtg cgttgatctc ttgctttctt gatccgtacg aaaccacatt 360

gccattgacg aacgtcacga acccgctaac actct 395

<210> 19
<211> 395
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora capsici (VZA 7 72F = Pcap 31)

<400> 19
ctataacgac aatgcctcga actgggcctt cggcaacggc ttcgtcatcg cgtcggcgat 60

catgtcgtcg gtaccaacat ggcgaatccg tagctgctcg tcctccacta ggtggcgcac 120

caagtggaac ttgttcataa tatgcttgct cttgctgtgc ttgccaggct tggcagttag 180

atagatgcac gacatgttat cgccgagtat ctccggagtc gcaaactccc agcatagttc 240

gtcacagagt ccacgtagcc actgtagatc tctggtacct tcattcatag caatatactc 300

tgcttccgtt gtgctctgtg cgttgatctc ctgctttctt gatccgtacg aaaccacatt 360

gccattgacg aacgtcacga acccgctaac actct 395

<210> 20
<211> 395
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora capsici (VZA 8 79F = Pcap 28)

<400> 20
ctataacgac aatgcctcga actgggcctt cggcaacggc ttcgtcatcg cgtcggcgat 60

catgtcgtcg gtaccaacat ggcgaatccg tagctgctcg tcctccacta ggtggcgcac 120

caagtggaac ttgttcataa tatgcttgct cttgctgtgc ttgccaggct tggcagttag 180

atagatgcac gacatgttat cgccgagtat ctccggagtc gcaaactccc agcatagttc 240

gtcacagagt ccacgtagcc actgtagatc tctggtacct tcattcatag caatatactc 300

tgcttccgtt gtgctctgtg cgttgatctc ctgctttctt gatccgtacg aaaccacatt 360

gccattgacg aacgtcacga acccgctaac actct 395

<210> 21
<211> 461
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Cutinase, Phytophthora capsici (VZA 9 84F = Pcap 01)

<400> 21
taataccact cgacaatgca tcgaacttga ccttcggcaa cggcttcgtc atcgcgtcgg 60

catcatgtcg tcggtaccaa catgccgaat ccgtagctgc tcgtcctcca ctaggtggcg 120

caccaagtgg aacttgttca taatatgctt gctcttgctg tgcttgccag gcttggcaat 180

tagatagatg cacgacatgt tatcgccgag tatctccgga gtcgcaaact cccagcatag 240

ttcgtcacag agtccacata gccactgtag atctctggta ccttcattca tagcaatata 300

ctctgcttcc gttgcgctct gtgcgttgaa cccttgcttt cttgatcctc actaaaccac 360

attgccattg acgaacgtca ctaacctct aacactcttt agatcattaa tatcattagc 420

ctaatcaaca aactcctaat acctcagatt cactacaatc c 461

<210> 22
<211> 467
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora capsici (VZA 10 87F = Pcap 32)

<400> 22
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggc 467

<210> 23
<211> 416
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora capsici (VZA 11 89F = Pcap 03)

<400> 23
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct tcagattcac gtcgtt 416

<210> 24
<211> 466
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora capsici (VZA 12 90F = Pcap 22)

<400> 24
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccgg 466

<210> 25
<211> 467
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora capsici (VZA 13 91F = Pcap 25)

<400> 25
tcaaaccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcaa atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggg 467

135

<210> 26
<211> 466
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora palmivora (VZA 14 81F = Ppal 02 )

<400> 26
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccgg 466

<210> 27
<211> 465
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora palmivora (VZA 15 82F = Ppal 10)

<400> 27
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccg 465

<210> 28
<211> 467
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora palmivora (VZA 16 83F = Ppal 11)

<400> 28

136
131

tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatcttccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggc 467

<210> 29
<211> 466
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora palmivora (VZA17 85F = Ppal 04)

<400> 29
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatcttccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccgg 466

<210> 30
<211> 467
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora palmivora (VZA 18 86F = Ppal 05)

<400> 30
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatcttccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

137
13

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggg 467

<210> 31
<211> 420
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora cinnamomi (VZA 19 64R = Pcin Ri)

<400> 31
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga agccgttgcc tcgtcctcca ctaggtggcg 120

caccaagtgg aacttgttca taatatgctt gctcttgctg tgcttgccag gcttggcagt 180

tagatagatg cacgacatgt tatcgccgag tatctccgga gtcgcaaact cccagcatag 240

ttcgtcacag agtccacgta gccactgtag atctctggta ccttcattca tagcaatata 300

ctctgcttcc gttgtgctct gtgcgttgat ctcttgcttt cttgatccgt acgattcggt 360

catcagggtc attagcgtag tcagcatcgg tgtagcacgt cagattcacg tcgttcccgg 420

<210> 32
<211> 459
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora cinnamomi (VZA 20 77F = Pcin 01)

<400> 32
atcatctcga caatgcctcg aacttgtcct tcggcaacgg cttcgtcatc gcgtcggcga 60

tcatgtcgtc ggtaccaaca tggcgaagcc gtacctcgtc ctccactagg tggcgcacca 120

agtggaactt gttcataata tgcttgctct tgctgtgctt gccaggcttg gcagttagat 180

agatgcacga catgttatcg ccgagtatct ccggagtcgc aaactcccag catagttcgt 240

cacagagtcc acgtagccac tgtagatctc tggtaccttc attcatagca atatactctg 300

cttccgttgt gctctgtgcg ttgatctctt gctttcttga tccgtacgaa accacattgc 360

cattgacgaa cgtcacgaac ccgctaacac tctttcggtc atcagggtca ttagcgtagt 420

cagcatcggt gtagcacgtc agattcacgt cgttcccgg 459

<210> 33
<211> 442
<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora citrophthora (VXA 21 63R = Pcto Ri)

<400> 33
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacgtgggat cggcgttgct cgtcctccac taggtggcgc 120

accaagtgga acttgttcat aatatgcttg ctcttgctgt gcttgccagg cttggcagtt 180

agatagatgc acgacatgtt atcgccgagt atctccggag tcgcaaactc ccagcatagt 240

tcgtcacaga gtccacgtag ccactgtaga tctctggtac cttcattcat agcaatatac 300

tctgcttccg ttgtgctctg tgcgttgatc tcttgcttct ttgatccgta cgaaaccaca 360

ttgccattga cgaacgtcac gaacccgcta acactcttct ggtcatcagg gtcattagcg 420

tagtcagcat cggtgtagca cg 442

<210> 34
<211> 442
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora citricola (VZA 22 66R = Pctr Ri)

<400> 34
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacgtgggat cggcgttgct cgtcctccac taggtggcgc 120

accaagtgga acttgttcat aatatgcttg ctcttgctgt gcttgccagg cttggcagtt 180

agatagatgc acgacatgtt atcgccgagt atctccggag tcgcaaactc ccagcatagt 240

tcgtcacaga gtccacgtag ccactgtaga tctctggtac cttcattcat agcaatatac 300

tctgcttccg ttgtgctctg tgcgttgatc tcttgctttc ttgatccgta cgaaaccaca 360

ttgccattga cgaacgtcac gaacccgcta acactctttc ggtcatcagg gtcattagcg 420

tagtcagcat cggtgtagca cg 442

<210> 35
<211> 469
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora megakarya (VZA 23 80F = Pmek 01)

<400> 35
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggcaa 469

<210> 36
<211> 463
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora megasperma/ P. sojae (VZA 24 92F = Pmeg 01)

<400> 36
cagaccatct cgacaatgcc tcgaacttgt ccttcggcaa cggcttcgtc atcgcgtcgg 60

cgatcatgtc gtcggtacca acatggctaa tcctagctgc tcatcctcca ctaggtggcg 120

caccaagtgg aacttgttca taatatgctt gctcttgctg tgcttgccag gcttggcagt 180

tagatagatg cacgacatgt tatcgccgag tatctccgga gtcgcaaact cccagcatag 240

ttcgtcacag agtccacgta gccactgtag atctctggta ccttcattca tagcaatata 300

ctctgcttcc gttgtgctct gtgcgttgat ctcttgcttt cttgatccct acgaaaccac 360

attgccattg acgaacgtca cgaacccgct aacactcttt cggtcatcaa ggtcattagc 420

gtagtcagca tcggtgtagc acgtcagatt cacgtcgttc ccg 463

<210> 37
<211> 460
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinase, Phytophthora heve (VZA 25 93F = Phev 02)

<400> 37
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtgcc aacatgacga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacaaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt 460

<210> 38
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> M. persicae cathepsin FP

<400> 38
gggcccacaa gagcgaagat gc 22

<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> M. persicae cathepsin RP

<400> 39
atttcacgta aacgcctgac ttgtaactgg 30

<210> 40
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> P. infestans elicitin FP

<400> 40
gggcccgccc tcgtcggctc c 21

<210> 41
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> P. infestans rDNA FP

<400> 41
gggccctttc cgtaggtgaa cc 22

<210> 42
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> P. infestans rDNA RP

<400> 42
aaaccggtcg ccaactcgct ac 22

<210> 43
<211> 584
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Phialophora gregata rDNA

<400> 43
tgcggaagga tcattactag agcaaaggat agggagcacc ccacaggagc ttgctccgtg 60

gcgggctgcc cgtcgagcct ctcgaagaag ctcggtcctg aactccaccc ttgaataaat 120

taccttttgtt gctttggcgg gccgcctcgc gccagcggct tcggctgttg cgtgcccgcc 180

agaggaccac aactcttgtt tttagtgatg tctgagtact atataatagt taaaactttc 240

aacaacggat ctcttggttc tggcatcgat gaagaacgca gcgaaatgcg ataagtaatg 300

tgaattgcag aattcagtga atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc ctctggtatt 360

ccgggggggca tgcctgttcg agcgtcatta taaccactca agctctcgct tggtattggg 420

gttcgcggtt ccgcggcccc taaaatcagt ggcggtgcct gtcggctcta cgcgtagtaa 480

tactcctcgc gattgagtct ggcaggtcta catgccagca acacccaaat ttttacaggt 540

tgacctcgga tcaggtaggg ataccccgct gaacttaagc atat 584

<210> 44
<211> 658
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Phialophora gregata Genotype B DNA Marker

<400> 44
ctccaccaac taagaacggc catgctggac acgaccactc cggtcatgat cactcccacg 60

accacggaaa gggcaaagct atcgatacca gtgaggacaa gaaggatgag gatgaggatg 120

atggagagga ggttgatgct actggacttg aggacaagga tattgagttg gtcatgaccc 180

aagctagcgt ctcacgaaac aaggctgtca aggcattgaa ggagaacgac aatgatatag 240

tcagctctat tatggctcta agcatataga gagttgacct gttatattcg tctggctgct 300

agactgaact tggctcgttg gaggacgttg tatggagcat gcgtaccctg catctctatc 360

tggggatatg tattctgaaa aagcacttgt ggaacttcaa gtccaaattc tcagaaattt 420

gcacacttgc tacccaatcc tcgtgtatat tgtgactacc ctatacctgt ttgttgtggc 480

ggagatgaag tacctaaaag tttgtgcatt tactctgata tttgatgttc gcgactatgt 540

aggctgccag gaactcccca atagtatgaa tcaagaaatc ggtgcaggga cgtgtaccaa 600

gttagagaac taggtagact ttgaacaatc gctgcatggc cgttcttagt tggtggag 658

<210> 45
<211> 1096
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sclerotinia sclerotiorum RNA Pol Subunit

<400> 45
ctgttccgca gattaacaac agatgtctac aggtacctgc aacgttgcgt ggaaaacaac 60

agagagttca atttgacgct gggtgtgaaa tccacgacga tcacgaacgg tctgaaatat 120

tctttggcta caggtaactg gggtgaccag aagaaggcag caagttctac cgctggtgtt 180

tctcaagtat tgaacagata taccttcgca tcaacacttt ctcatttgcg ccgaaccaat 240

acgcctatcg gacgtgatgg aaagatcgcc aaacctagac aactgcataa tactcattgg 300

ggtctggttt gtccagcaga gacgccagaa ggtcaagctt gtggtttggt caagaattta 360

gctttgatgt gttacgttac agttggtacg ccaagtgatc caatcgttga gttcatgatt 420

caacgaaata tggaagtgct ggaggagtat gaaccgctcc gagcacccaa tgcaacaaag 480

gtcttcgtca atggtgtttg ggttggtgtc catcgagacc ctgcccattt ggttaaatgt 540

gtacaagatc ttcgtagatc acatttgatt tctcatgaag tctcacttat tcgagaaatt 600

cgagacagag agttcaagat tttcactgat gcaggacgag tgtgcagacc tctgttggtc 660

atcgacaatg atccagacag ccccaacaaa ggtaatttgg tactgaacaa ggatcacatc 720

cgccgtttgg aggatgatca atctctgcca tcgaacatgg ataaggatga gaaagtacac 780

catggttatt atggattcca aggtttgatt aatgatggtg tggttgaata tttagacgcc 840

gaggaagagg agactgttat gattaccatg acacctgaag atttggatat ttctcgacag 900

cttcaagctg gttatcaaat tcgtcctgat gacagcggtg atttgaataa gcgtgtcaag 960

gcacctatca atccaactgc gcacgtctgg actcattgtg aaattcatcc aagtatgatt 1020

ctgggtatct gtgcaagcat cattcccttc ccggatcata atcaggtaag ctttaagtcc 1080

aataatgaat ttatta 1096

<210> 46
<211> 883
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Puccinia hordei 18S ribosomal RNA gene

<400> 46
agtgaaactg cgaatggctc attaaatcag ttatagttta tttgatgata ccttactaca 60
tggataactg tggtaattct agagctaata catgctgaaa agccccaacc tttggaaggg 120
gtgtatttat tagataaaaa accaatggcc cttgggtctc cttggtgatt cataataact 180
tctcgaatcg catggccttg tgccggtgat gcttcattca aatatctgcc ctatcaactt 240
tcgatggtag gatagaggcc taccatggtg atgacgggta acggggaata agggttcgat 300
tccggagaga gggcctgaga aacggccctc aaatctaagg attgcagcag gcgcgcaaat 360
tacccaatcc tgacacaggg aggtagtgac aataaataac aatgtatggc tcttttgggt 420
cttacaattg gaatgagtac aatttaaatc tcttaacgag gatcaattgg agggcaagtc 480
tggtgccagc agccgcggta attccagctc caatagcgta tattaaaatt gttgacgtta 540
aaaagctcgt agtcgaactt cggcctctgg cagttggtcc gccttttggt gtgtactgat 600
ttgttggagg cttacctctt ggtgaacttc aatgcacttt actgggtgtt gaaaggaacc 660
aggactttta ctttgaaaaa attagagtgg ttcaaagcag cttatgcctg aatacattac 720
catggaataa taaaatagga cgtgtgattc tattttgttg gtttctagga ttaccgtaat 780
gatgaataag gtcagttggg ggcatttgta ttacatcgtc agaggtgaaa ttcttggatt 840
gatgtaagac aaactactgc gaaagcatct gccaaggatg acc 883

<210> 47
<211> 2040
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sclerotinia sclerotiorum Hexose Transporter

<400> 47
ggagactgct gagtctcctg ttattaccga caagaacctc agcagcgctg aaggaactcc 60
agcagcacac acaccagccg atactcctcg tgtcgtcaga tccttaaatg gttctgcacc 120
agagcatcat gatatagtac ccgaggaagc tctcgacaac ttgcctgtca ccaaattagc 180
tattatgctt ggtgctatcg catctatcgg tggtttcatg ttcggttatg aatctggtca 240
aatttctggt ttcgtccaaa tgtccgactt cttagatcga ttcggtgaaa atggtgaact 300
ttctgctgtc cgtcaaggaa ccatcgtcgc cattctctgc gccggtactc ttgttggatg 360
ccttggatct agttacctct gcgatacaat cggtcgtcgt tacactatct ccagttctgc 420
attcttctac atcatcggtg ttatcatcga aatcacttct tctactcact gggttcaatt 480
cgctatgggg agattcactg ctggtgtgaa tgctcccttt aagtttcaat tttagtatct 540
aaactctgta ttataagttg ggtattggtg ctttgagtac tagtgttcct atgtaccaat 600

ctgagtctgt gccaaagaac attcgtggtg ctgtcgttc cagttatcag ttgttgatta 660

ctcttggtat ctggactgct tatatgatca actacggaac tcattctgcc tataccaaca 720

gtgcacagtg gcggattcct aacggtctct ccgcactctg ggccatcatc ctcggtaccg 780

ctgtcctctt catgcccgaa tccctcgctt tgcataccgt atcggacgtg aagatgaaag 840

ctcgcaaaaa catggctctc ctcaacggtg ttgacccttа ctccccactt atcgattccg 900

agatccaaga aatcgaacaa aagctcgcag ccgaaagaga aggtggtgat caccctggt 960

acgaaatctt tactggccct gttgttccat ttctttcatg atgaattcct tttaaccttg 1020

aacgtgatct catagagaat gttgtaccga acacttctcg gaatggttct tcaagctggt 1080

caacaattga ctggtgccaa tttcttcttc tactatggta ctaccatctt caagtctggt 1140

ggtatctccg attcttatgt tacctctatc attctcggta ccgtcaatgt cgtcgctacc 1200

attggtggtc tctggattgt taagaactgc ggtcgtagga aggctctcat ggttggtgct 1260

gccgagatgt ttgtttgcat gttgatctac tctttcgtcg gacacttcaa gatccaaaga 1320

caagcccaat gctcaagccc ctgggctgtt ttgatttgtt tcacctgtat ctacattgtt 1380

ggatctgcta ctacatgggg acctttggtt tgggccattg tcggagaatt atacccagca 1440

cgttacagag cttcttgcat ggctctcgcc accgcatcga actggctctt caacttcctt 1500

atctctttct tcaccacatt tatcaccaac gatatcgatt actactatgg tcttgtcttt 1560

gccggatccc ttttcgctct cttctggatt gtatacttct tcgttatcga gaccaaggat 1620

cgctcccttg aggaaatcga caccatgtac gtcctccacg tcaacccacg aacatcctcc 1680

acttgggacc ccaagtccct cggtgccgaa ggtgtcaaag gtgttgatac cgatggaatg 1740

ttcttgacca ctggagggaa agatattaag aagagtgaga tggctggacg accaatgttg 1800

gaacatgacg agagaaggtt ccctgagacc gctggaggag ctgcttctca ggagcacaaa 1860

cctgagatta tgaatgctta agcttcgctt cattttgat gagcatggat gaaagaaaaa 1920

tgcattttac gaatgtatgt cgttactacg agcaaaaagg ggggtgaaat cagtggatga 1980

taaataaacg atggaatata taatgcatgc atataatggc gtttgggaag cagcatcgtc 2040

<210> 48
<211> 883
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fusarium solani pisi cutinase

<400> 48
aaccacacat accttcactt catcaacatt cacttcaact tcttcgcctc ttcctttca 60

ctctttatca tcctcaccat gaaattcttc gctctcacca cacttctcgc cgccacggct 120

tcggctctgc ctacttctaa ccctgcccag gagcttgagg cgcgccagct tggtagaaca 180

actcgcgacg atctgatcaa cggcaatagc gcttcctgcc gcgatgtcat cttcatttat 240

gcccgaggtt caacagagac gggcaacttg ggaactctcg gtcctagcat tgcctccaac 300

cttgagtccg ccttcggcaa ggacggtgtc tggattcagg gcgttggcgg tgcctaccga 360

gccactcttg gagacaatgc tctccctcgc ggaacctcta gcgccgcaat cagggagatg 420

ctcggtctct tccagcaggc caacaccaag tgccctgacg cgactttgat cgccggtggc 480

tacagccagg gtgctgcact tgcagccgcc tccatcgagg acctcgactc ggccattcgt 540

gacaagatcg ccggaactgt tctgttcggc tacaccaaga acctacagaa ccgtggccga 600

atccccaact accctgccga caggaccaag gtcttctgca atacagggga tctcgtttgt 660

actggtagct tgatcgttgc tgcacctcac ttggcttatg gtcctgatgc tcgtggccct 720

gcccctgagt tcctcatcga gaaggttcgg gctgtccgtg gttctgcttg aggaggatga 780

gaattttagc aggcgggcct gttaattatt gcgaggtttc aagtttttct tttggtgaat 840

agccatgata gattggttca acactcaatg tactacaatg cct 883

<210> 49
<211> 595
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Phakopsora pachyrhizi cutinase homolog

<400> 49
gagattgtgc tgtgcattgc acagcacagc agcaattcca acatcccccc ttgctcacag 60

tcttcaaggc tttgagcaca gattgagaac tttaagagat ttgaggagtg gtgattttcc 120

cagaggtttg gtgaggaagt cagccaacat atcttcactc ttgacatatg ttaaggatat 180

gtgttgtttc tcaatttctt gcttgacaaa atgaagtctg atgtccatat gttttgtctt 240

gaaggttgag tgactagctt gattatttgc aagttctatt gctccttgat tgtcctcaca 300

gatcgtcgtt ggagtatgaa atggcaggtt gaagaagttg gcgatcaagg ttttgatcca 360

cataacttcc ttggtgacgt cagcaattga cttgtactct gcttctgttg ttgagagaga 420

tattgttggt tgcttttgtg acttccaaga gatgaggttg ccattccata ggaccaagaa 480

tccagatacc gaacgacgag tttgaggaca ggaggcccag tctgcatctg agtaagccaa 540

gagattgttg ccaggaggag actttgtgaa tgtgagacca taggtttttg tatgc 595

<210> 50
<211> 668

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Phakopsora pachyrhizi rDNA

<400> 50
ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaataaaa 60

agctaaagag tgcactttat tgtggctcaa aactaaactt tttaataaac ccatttaatt 120

ggctcattga ttgataagat ctttgggcaa tggtagcttt gaaaaaagct gcaacccacc 180

tattaatcat aatcttttt ttttaactc aaagtcaaat agaatgtttt ataaatttaa 240

atatatatat ataacttta acaatggatc tctaggctct catatcgatg aagaacacag 300

tgaaatgtga taattaatgt gaattgcaga attcagtgaa tcatcaagtt tttgaacgca 360

ccttgcacct tttggtattc caaaaggtac acctgtttga gtgtcatgaa atcttctcaa 420

cattatttct ttttttaaa gggaaattgt tggattttga gtgttgctgt tgctttttt 480

gcagctcact ttaaataaat aaatatatat aagtttcagt atattttgat gtaataataa 540

aatcatttca tcaaaaaaat aaatatatgt gagatttatt ataacattaa ttgaatgtaa 600

attttttttt aagacctcaa atcaggtgag actacccact gaacttaagc atatcaataa 660

gcggagga 668

<210> 51
<211> 624
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fusarium sambucinum translation elongation factor 1 alpha

<400> 51
tcgtcgtcat cggccacgtc gactctggca agtcgaccac tgtaagttga cccaaatcta 60

agctcgccta caattggcgg ggtagcctca agatacgctt gtgctgacat acatcataga 120

ccggtcactt gatctaccag tgcggtggta tcgacaagcg aaccatcgag aagttcgaga 180

aggttggtct cattttcctc gatcgcgcgc cctactttcc atcgatccat cattcgaatc 240

gctctgatac gactcgacac acgcctgcta ccccgctcga gttcaaaaat tttacgactt 300

tgtcgtaatt tttttggtgg ggctcatacc ccgccacttg agcgacatgc ccttcctcta 360

aagccacggg cgcgcatcat cacgtgttga tcagttacta acaacctgtc aataggaagc 420

cgccgagctc ggtaagggtt ctttcaagta cgcttgggtt cttgacaagc tcaaagccga 480

gcgtgagcgt ggtatcacca tcgatatcgc tctctggaag ttcgagactc ctcgctacta 540

tgtcaccgtc attggtatgt tgtcactacc acctccatca cattcccgca ctaactcacc 600

tatcagacgc tcccggtcac cgtg 624

<210> 52
<211> 279
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Phytophthora infestans elicitin gene

<400> 52
gccctcgtcg gctccacttc cgccaccacg tgcaccacct cgcagcagac cgtagcgtac 60

gtggcgctcg taagcatcct ctcggacacg tcgtttaatc agtgctcgac ggactccggc 120

tactcgatgc tgacggccac ctcgctgccc acgacggagc agtacaagct catgtgcgcg 180

tcgacggcgt gcaagacgat gatcaacaag atcgtgtcgc tcaacgctcc cgactgcgag 240

ctgacggtgc caactagtgg cctggtactc aacgtgttc 279

<210> 53
<211> 1096
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sclerotinia sclerotiorum RNA Polymerase Subunit

<400> 53
ctgttccgca gattaacaac agatgtctac aggtacctgc aacgttgcgt ggaaaacaac 60

agagagttca atttgacgct gggtgtgaaa tccacgacga tcacgaacgg tctgaaatat 120

tctttggcta caggtaactg gggtgaccag aagaaggcag caagttctac cgctggtgtt 180

tctcaagtat tgaacagata taccttcgca tcaacacttt ctcatttgcg ccgaaccaat 240

acgcctatcg gacgtgatgg aaagatcgcc aaacctagac aactgcataa tactcattgg 300

ggtctggttt gtccagcaga gacgccagaa ggtcaagctt gtggtttggt caagaattta 360

gctttgatgt gttacgttac agttggtacg ccaagtgatc caatcgttga gttcatgatt 420

caacgaaata tggaagtgct ggaggagtat gaaccgctcc gagcacccaa tgcaacaaag 480

gtcttcgtca atggtgtttg ggttggtgtc catcgagacc ctgcccattt ggttaaatgt 540

gtacaagatc ttcgtagatc acatttgatt tctcatgaag tctcacttat tcgagaaatt 600

cgagacagag agttcaagat tttcactgat gcaggacgag tgtgcagacc tctgttggtc 660

atcgacaatg atccagacag ccccaacaaa ggtaatttgg tactgaacaa ggatcacatc 720

cgccgtttgg aggatgatca atctctgcca tcgaacatgg ataaggatga gaaagtacac 780

catggttatt atggattcca aggtttgatt aatgatggtg tggttgaata tttagacgcc 840

gaggaagagg agactgttat gattaccatg acacctgaag atttggatat ttctcgacag 900

cttcaagctg gttatcaaat tcgtcctgat gacagcggtg atttgaataa gcgtgtcaag 960

gcacctatca atccaactgc gcacgtctgg actcattgtg aaattcatcc aagtatgatt 1020

ctgggtatct gtgcaagcat cattcccttc ccggatcata atcaggtaag ctttaagtcc 1080

aataatgaat ttatta 1096

<210> 54
<211> 538
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> tenocarpella maydis rRNA

<400> 54
gggggacgat tattctttct gaaccctgtg aactacctaa acgttgcttc ggcgggaata 60

gacggccccg tgaaacgggc cgccccccgcc agaggaccct taactctgtt tctataatgt 120

ttcttctgag taaaacaagc aaataaatta aaactttcaa caacggatct cttggctctg 180

gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat 240

catcgaatct ttgaacgcac attgcgcccg ccagtattct ggcgggcatg cctgttcgag 300

cgtcattaca acctcaggcc cccgggcctg gcgttgggga tcggcggagc cccccgtggg 360

cacacgccgt cccccaaata cagtggcggt cccgccgcag cttccatcgc gtagtagcta 420

acacctcgcg actggagagc ggcgcggcca cgccgtaaaa cacccaactc ttctgaagtt 480

gacctcgaat caggtaccaa tacccgctga acttaagcat atcaataagc cgggagga 538

<210> 55
<211> 536
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cercospora zeae-maydis 18s rDNA

<400> 55
tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta ccgagtgagg gccttcgggc tcgacctcca 60

acccttttgtg aacacaactc gttgcttcgg gggcgaccct gccgtttcga cggcgagcgc 120

ccccggaggc cttcaaacac tgcatctttg cgtcggagtt taagtaaatt aaacaaaact 180

ttcaacaacg gatctcttgg ttctggcatc gatgaagaac gcagcgaaat gcgataagta 240

atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa cgcacattgc gccctttggt 300

attccgaagg gcatgcctgt tcgagcgtca tttcaccact caagcctagc ttggtattgg 360

gcgccgcggt gttccgcgcg cctcgaagtc tccggctgag ctgtccgtct ccaagcgctg 420

tgatttcatt aatcgcttcg gagcgcgggc ggtcgcggcc gttaaatctt tccaaggttg 480

acctccggat caggtaggga tacccgctga acttaagcat atcaataagc gcagga 536

<210> 56
<211> 1017
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Myzus persicae cathepsin B protease

<400> 56
atggctaggg tattgatgtt attgtctgtg atcttcgtca gcgtttatat gacggaacaa 60

gcatacttct tggaaaaaga tttcattgac aatatcaatg cacaagcgac tacatggaag 120

gctggtgtga acttcgaccc caaaacatca aaggaacata tcatgaaact tttgggatca 180

aggggagtac aaattccaaa caaaaataat atgaatttgt acaagagcga agatgcagag 240

tacgacaaca catacattcc aaggttcttt gacgctagga gaaaatggag acattgtagt 300

acgatcggaa gagtccgtga ccaaggaaac tgtggatctt gttgggctgt ggccactagc 360

tcggctttcg ctgaccgttt gtgtgtagca acaaatgcag acttcaacga attattatcc 420

gccgaagaaa tcactttctg ctgtcataca tgtggcttcg gatgcaacgg tggttacccg 480

attaaagcat ggaaacgttt tagtaaaaaa ggtttagtca ccggaggaga ctacaaatct 540

ggagagggtt gtgaaccata cagagttcca ccttgtccta atgacgacca aggaaataat 600

acatgcgccg gtaaaccaat ggaatcaaac cacaggtgta ccaggatgtg ctacggtgac 660

caggacctcg acttcgacga agaccacaga tacacacgtg attactacta cctaacatac 720

ggtagcatcc aaaaggacgt catgacttac ggaccaattg aagcatcgtt cgatgtatac 780

gacgatttcc ccagttacaa gtcaggcgtt tacgtgaaat cggaaaatgc ttcatacttg 840

ggaggacatg ccgttaaatt gatcggttgg ggtgaagaat acggagtgcc atactggttg 900

atggtcaact catggaacga agattggggt gaccatggtt ttttcaaaat tcaacgaggc 960

acaaacgaat gtggagtcga taattcgaca actgctggtg taccagttac caactaa 1017

<210> 57
<211> 248
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Leptinotarsa decemlineata cysteine protease

<400> 57
attatgggcc cgggggatca aactggaatt cagtgggtgg gattggaata taacatcatt 60

ttcatggatg aagttcttca ttatattctt ttttctctcg ccgcaacaga agctcttagt 120

150
150

gataagggag aaatggcaga atttcaaaat caatttctcc aagtcctacc aaaacgtggt 180

agaagaaaaa gggcgtttca atattttcct gtcgaatttg ttgaggatcg aagaacacaa 240

ccaaaatt 248

<210> 58
<211> 519
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Verticillium dahliae rDNA

<400> 58
aggacattac gagtatctac tcataaccct ttgtgaacca tattgttgct tcggcggctc 60

gttctgcgag cccgccggtc catcagtctc tctgtttata ccaacgatac ttctgagtgt 120

tcttagcgaa ctattaaaac ttttaacaac ggatctcttg gctctagcat cgatgaagaa 180

cgcagcgaaa cgcgatatgt agtgtgaatt gcagaattca gtgaatcatc gaatctttga 240

acgcacatgg cgccttccag tatcctggga ggcatgcctg tccgagcgtc gtttcaaccc 300

tcgagcccca gtggcccggt gttggggatc tacgtctgta ggcccttaaa agcagtggcg 360

gacccgcgtg gcccttcctt gcgtagtagt tacagctcgc atcggagtcc cgcaggcgct 420

tgcctctaaa ccccctacaa gcccgcctcg tgcggcaacg gttgacctcg gatcaggtag 480

gaatacccgc tgaacttaag catatcaata agcggagga 519

<210> 59
<211> 762
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Peronospora manchurica rDNA

<400> 59
ctaaaaaaac tttccacgtg aaccgtatca acctttttaaa ttggggacaa tgatcttggt 60

ggaggcttct agtcttttgg ctagctgttc actactataa gtgagtccta tcatatcgaa 120

ccattagaca tgaatttgtc atatgaagta gaagaagtta taaacccctta cctaatttac 180

tgattatact gtggggacga aagtctctac ttttattcta gataacaact ttcagcagtg 240

gatgtctagg ctcgcacatc gatgaagaac gctgcgaact gcgatacgta atgcgaattg 300

ctaaattcag tgagtcatcg aaattttgaa cgcatattgc acttctcggg ctagtctcct 360

gaagtatgcc tctatcagtg tccacacaac aaacttggct ttctttttttc cgtgtattcg 420

gtgaaggata tgccagatat gaagtgtctt gccctcaatt ttcgaattgg ccgcaagtcc 480

ttttaaatgt aaagactgta cttattgtgc ttgaaaagcg tgacgatact agtttagaaa 540

ctgttcgttt ggccagtcgg cgacgagttt gttaactata actttatgga gaattattcg 600

atttgcggta tgattggctt cggctgaact acgtttattg gattcttttt gtcggttata 660

gaagtatgaa cttgtgaacc gtagctaagc atgtgatgga ttttttttacc tgtgttattg 720

ctgcgaagta aagtgtcaac ttcggttgtc cgataagtcg ac 762

<210> 60
<211> 521
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Meloidogyne chitwoodi cytochrome oxidase II

<400> 60
ggtcaatgtt cagaaatttg tggtgttaat cattctttta tgcctattat aattgaggtt 60

gttttatttg attttttttaa gataagttta attagctttt tattttatta gaatttttta 120

ttgtgattaa aaaagatttg agctaatata ttatttttttg ttgttgaaaa aattaaaaaa 180

aaattataag ttataataat taaaattcta aaaaaggatt atttgttttt tagttaaata 240

ttataaatat aatggtttaa aaaagagaaa ttttgattag aataatatta gttttttttt 300

atatttttta taataattgt ttatttttta taattatttt tttttataaa aataatttaa 360

ttattattat tttatttaaa aaaattaatt aaattaattt ttttgttaaa ttagtttaaa 420

tataaaatgt tttttaaaat ctgatgaatt tttggtttta atttttttatt tctgctcagt 480

gatttattga atggtatctt tagcgtgatt ggtcaaaggt a 521

<210> 61
<211> 1773
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Pratylenchus scribneri rDNA

<400> 61
gcttgtctca aagattaagc catgcatgta taagtataaa cgctctgaag cgtgaaaccg 60

cgaacggctc attacaacag ctataattta cttgatcttg attacctact tggataactg 120

tggwaattct agagctaata catgcaccaa agctccaacc cgtaagggaa gagcgcatty 180

attagaacaa aaccatgcgg cttcggccgc tcaatgttga ctcagaataa ctaagctgat 240

cgcatggtct tgtaccggcg acgtgtcttt caagtatctg ccttatcaac tttcgatggt 300

actgtcattg actaccatgg tggtgacggg taacggagga tcagggttcg actccggaga 360

aggggcctga gaaatggcca ctacgtctaa ggatggcagc aggcgcgcaa attacccact 420

ctcagaacaa tttgaggagg tagtgacgag aaataacgag accgttctca acagaggccg 480

gtcatcggaa tgggtacwat ttaaaaccctt taacgagtat ctatgagagg gcaagcctgg 540

tgccagcagc cgcggtaatt ccagctctca aaatgcatag aattattgct gcggytaaaa 600

agctcgtagt tggatctgtg ccgacagact ggtccatctt cggatgcgta ctggttattg 660

tcggctttcc tgcagttttg cggctcagtg cctctcacgg ggtgcagtgt ccgttgctgc 720

aagtttactt tgaacaaatc agagtgctct aaacaggcgt ttcgcttgaa tgttcgtgca 780

tggaataata gaagaggatt tcggttctat tttattggtt ttatagactg agataatggt 840

taacagagrc aaacgggggc attcgtattg ctacgtgaga ggtgaaattc ttggaccgta 900

gcaagacgaa ctacagcgaa agcatttgcc aagaatgtct tcattaatca agaaygaaag 960

tcagaggttc gaaggcgatc agataccgcc ctagttctga ccgtaaacga tgccaactag 1020

ckatccgccg gcggaattct tgccctggtg gggagcttcc cggaaacgaa agtcttccgg 1080

ttccgggggа agtatggttg caaagctgaa acttaaagga attgacggaa gggcaccacc 1140

aggagtggag cctgcggctt aatttgactc aacacgggaa aactcacccg gcccggacac 1200

cgtaaggatt gmcagattga tagctttttc atgattcggt ggatggtggt gcatggccgt 1260

tcttagttcg tggagcgatt tgtctggytt attccgataa cgagcgagac tctggcctac 1320

taaatagtcg gcgcattgtc tctgtgtgca tgacttctta gagggatttt cggtgttcag 1380

ccgcacgaaa ttgagcaata acaggtctgt gatgccctta gatgtccggg gctgcacgcg 1440

cgctacactg gcaaaatcag cgtgcttgtc ctcctccgaa aggagttggt aaaccattga 1500

aaatttgccg tgattgggat cggaaattgc aattattttc cgtgaacgag gaaytccaag 1560

taagtgcgag tcatcaactc gcgttgatta cgtccctgcc ctttgtacac accgcccgtc 1620

gctgcccggg actgagccat ttcgagaaac ttggggaccg ctgatttgca gtctttcggg 1680

cctgcttatt ggtgggaacc aatttaatcg cagtggcttg aaccgggcaa aagtcgtaac 1740

aaggtagctg taggtgaacc tgcagctgga tca 1773

<210> 62
<211> 949
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Heterodera glycines rDNA

<400> 62
gtgattccta ttcaccacct acctgctgtc ctgttgggct agcgttggca ccaccaaatg 60

cccccgtccg ctgatgggca caggtcgttc gagatgactt gtggacgctg cccaacatta 120

cggggcagct gcctcacgag ccatgctttt ggggtgcttc catacgttgg agctgtggta 180

taccgctcag tgctgcacat gtgaaagcct gtgtatggct gctgcgtggc aatgtgtcgg 240

tggcgggccg cctcgcttgg ctggttcgct gcgccaatgt gggatgcacg ctcgtggggc 300

gacctaacgg ctgtgctggc gtctgtgcgt cgttgagcgg ttgttgtggc aggcacataa 360

cacactgact ggggatggtg gtttcgttcc cggtcttacg tgccgtaact agcggtgtgt 420

ttgtgcttgc tgctacgtcc gtggccgtga tgagacgacg cggtaggggcc cgtgcttggc 480

ctagcacgtg gcttaagact caatgagtgt cagctcgggc accgccagct ttttcttttt 540

tttttcatta ttttttttta cacttctgtt gaagaatgaa ttctagtctt atccggtgga 600

tcactcggct cgtggatcga tgaagaacgc agccaactgc gataattcagt gcgaactgca 660

gaaaccttga acacaaaaca ttcgaatgca cattgcgcca ttggagttac atccattggc 720

acgcctggtt cagggtcgtt accataaaat gcactgcttg tgcgttgctt cgtgggatca 780

tgtacttgta cgtgttctta cgttacttgc tcagctcggc tgtggggttt tggtgtgctg 840

gcgcgaactt gtggttctaa ttcgcgtttt acggaccgta actcgggcgc accaatgctt 900

tgcatgctgt ggcggagtgc ctggattact ggcattacct gctttgatt 949

<210> 63
<211> 1120
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Magnaporthe grisea RNA polymerase II

<400> 63
atgaagcctg aggacctaaa gaaaatggac attgccacaa aagacacaga cgcacggcga 60

cctggtcacc ttcgagccct taaccgtagc agcgacaccg atttcaccga ctcccgccta 120

aaaccagaac cgcttcgtct aggtcgcagg gatgtttctg gtgcagaatc gactcacatg 180

tctctcgacg acagtctgat gtcaccagat ccaggggcat tggcaggtga tgaagactca 240

gatctgggaa aatgcgagcg caactgggag gcggagagct taggatcgcc cgtcagcaac 300

ggtatacata gcccatccaca catgggtgag caagcacctc ccttttcgga ctacaaccct 360

tctgaatctc ctccagaagc aatcgtacat cgagagcaag gtgattctgc ccagatggac 420

gcgaaatcct cgtcgcaatc gcggcactct gtctatgcta acttggtagt tcctgagtcc 480

aaaccactaa cccgacaatc cagcctggct cagctccgac agcctattga ggcaaaggca 540

gaagctcgtt ccaggccagc gtccattcta atagttccta cacaggggag tgctacgccc 600

tcgataaata ctcctatatt tgagaaaaga ttggcaacca gaagcccaga gactccgtca 660

attgtacagc cagcaaatat ttcgacgccc agttccatgg ttcataagaa ggagtctgca 720

ggaacccata gtcgaccagc tatacaatcc tctttctccg attcacccaa tgcagcttgg 780

cctggtaatt tgctttcagc caggggtcta gattacaaac tacgatcaag actgtccgag 840

ccagctcttg taagaagcgg ccagaaaaaa ccgtctagtg ttggcgggca tcctggatat 900

accactcccg taccggttac accccaaagg cctgtgacaa agtcttcggt cttacactca 960

agcccggtcc accacctaat gcgctctgca aataccgtgt cttctcgaca ttccattgcg 1020

acaacagata ggcatgctac aaccggtggc gcatctcaga gtggggtac gagccacaag 1080

ctgggagctc agtcgtgtcc gaaccgagtt gcagagcttc 1120

<210> 64
<211> 883
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Puccinia hordei 18S rDNA

<400> 64
agtgaaactg cgaatggctc attaaatcag ttatagttta tttgatgata ccttactaca 60

tggataactg tggtaattct agagctaata catgctgaaa agccccaacc tttggaaggg 120

gtgtatttat tagataaaaa accaatggcc cttgggtctc cttggtgatt cataataact 180

tctcgaatcg catggccttg tgccggtgat gcttcattca aatatctgcc ctatcaactt 240

tcgatggtag gatagaggcc taccatggtg atgacgggta acggggaata agggttcgat 300

tccggagaga gggcctgaga aacggccctc aaatctaagg attgcagcag gcgcgcaaat 360

tacccaatcc tgacacaggg aggtagtgac aataaataac aatgtatggc tcttttgggt 420

cttacaattg gaatgagtac aatttaaatc tcttaacgag gatcaattgg agggcaagtc 480

tggtgccagc agccgcggta attccagctc caatagcgta tattaaaatt gttgacgtta 540

aaaagctcgt agtcgaactt cggcctctgg cagttggtcc gcctttggt gtgtactgat 600

ttgttggagg cttacctctt ggtgaacttc aatgcacttt actgggtgtt gaaaggaacc 660

aggactttta ctttgaaaaa attagagtgg ttcaaagcag cttatgcctg aatacattac 720

catggaataa taaaatagga cgtgtgattc tattttgttg gtttctagga ttaccgtaat 780

gatgaataag gtcagttggg ggcatttgta ttacatcgtc agaggtgaaa ttcttggatt 840

gatgtaagac aaactactgc gaaagcatct gccaaggatg acc 883

<210> 65
<211> 802
<212> DNA
<213> Artificial

155
155

<220>
<223> Pseudoperonospora humuli rDNA

<400> 65
ccacacctaa aaactttcca cgtgaactgt ttcaacctca ttaattgggg gttttgtttg 60

gcggtgatcg ctagcttaat tgctggttga ttactgctag gcgagcccta tcatggcgag 120

cgtttgggct tcggtctgaa ctagtagctt ttatttt aaa ccctttctta attactgatt 180

atactgtggg gacgaaagtc tctgctttta actagat agc aactttcagc agtggatgtc 240

taggctcgca catcgatgaa gaacgctgcg aactgcg ata cgtaatgcga attgcaggat 300

tcagtgagtc atcgaaattt tgaacgcata ttgcact tcc gggttagtcc tgggagtatg 360

cctgtatcag tgtccgtaca tcaaacttgg ttttctt ctt tccgtgtagt cggtggagga 420

tatgccagat gtgaagtgtc ttgcggctaa ttttaga att gactgcgagt cctttgaaat 480

gtacagaact gtacttctct ttgctcgaaa agtgtgg cgt tgctggttgt gaaggctgtc 540

catgtgacca gtcggcgatc ggtttgtctg ctatggc att aatggaggaa tatttaattc 600

gcggtatgat tagcttcggc tgaacaggcg cttattg aac gtttttcctg ttgtggcggt 660

atgaactgat gaaccgtagt cgtgtgtgac ttggctt ttg aattggcttt gctattgcga 720

agtagagtgg cagtttcgac tgtcgagggt cgaccca ttt gggaactatg tgttgtgtgg 780

cttcggtcgc gcggcatctc aa 802

<210> 66
<211> 1260
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Botrytis cinerea cytochrome P450 monoxygenase

<400> 66
ctttattcga tattaatagt attatatgtt atacaga gac tataaag aaa atatatgttt 60

tccttttaa tattagattt ttacttttt ataataatga tttattttta ttattatatt 120

agtctcttta atattgaaat aatatttatt agaaaca ata taagaaatag ctaacttgaa 180

attaaaaagt ataaaatcta acaaatctat agaatag aat cttgtaaact ttattaaact 240

tgaaagatat ttaaatatat atttaagatc tcctaaa cct cctcttttta aatcagtcag 300

tagatctcct atattctaaa aattaagaaa gttagca tgt gaattaatat ttaggcaggt 360

gttccacacg atatctagaa aaggagcttc tagaccc tcc cgtctagacc ctcccgttta 420

gacccccccg tctagaccta ccctccggca aaccttc ggg tatttaccga atcaaaaagg 480

ctaggatgtg gggctgagta aactctagat tgtgacc ccc actatgggtc tgacagccct 540

agaaacaact taatctgttt ggatattgcg gggtttc act gcggagtctt gtatgtagat 600

cgaaagtcgc caagcccatg aaacatttca aggtgtaaag tatgttacgg atttaagttt 660

gcttccagcc caatcgtaag ccttatctct gacgttgaac tgaagtttag agtttcctgt 720

aagcatatac acttgaaagt acatcctcct caatctgcgg tgattatgcg ttttttttc 780

gcaactcttg taatacgaac acaactactc acaatcactc ttatgaaatt tacttgtccc 840

aaaaggacat catgctgctt agcattaaag acctgtctga aaaatacatc atgctgctcg 900

atgtcaaaga tctgtcgaca ctcaaaacaa ctgttgccgt tctagtgagt ccattattca 960

taccagaggg agggtaattc cttaacatga ccaggtcacg gtagcccttа ttgcacaagt 1020

cctttggaaa attttctttc acccgctcag tgcctttcca gggccgtggt tcaacaggat 1080

atccgaaata cccggctcgt gggttattgc aactgggaag cagcactcat attaccggaa 1140

gcttcatgaa aaatatggtg agtaactatt cctgtacctt gctccttctt tcgggaaaca 1200

agttcatact aaaacaaatt caggcccagt tgtgagagtt gccccaaatg agctcagctt 1260

<210> 67
<211> 536
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Pseudomonas syringae rDNA

<400> 67
atcgacgact cagctgcacc ataagcaccc acacgaattg cttgattcat tgaagaagac 60

gatgagaagc agcttttgct ttgcacaccc gattttgggt ctgtagctca gttggttaga 120

gcgcaccccт gataagggtg aggtcggcag ttcgaatctg cccagaccca ccagttacct 180

ggtgaagttg gtcagagcgc gtacgacacc cggatacggg gccatagctc agctgggaga 240

gcgcctgcct tgcacgcagg aggtcagcgg ttcgatcccg cttggctcca ccacttactg 300

cttctgtttg aaagcttaga aatgagcatt ccaccctgag agattgaagg gtgcgtgaat 360

gttgatttct agtctttgat tagatcgttc tttaaaaatt tgggtatgtg atagaaagaa 420

atatagaccg ggcacctctt tcactggtgc gtgtccgggc taaggtaaag tttgtgaaat 480

gcaaactttc ggcgaatgtc gtcttcacag tataaccaga ttgcttgggg ttatat 536

<210> 68
<211> 983
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Clavibacter michiganense michiganense Cel A gene

<400> 68

atgactgttc gacaagttag tgtaccctta gtgtccaagc tcttcctttt ctttgcattg 60

gcggtcggcg ccacgtttgg cgcattcgcg gcgcctgcct tagccgccac cgcagcgggg 120

accggtgcgg tggcctcgcc gcctggatgg ctgcacacgg cgggtgggaa gatcgtcacc 180

gcctccggcg ctccgtacac aatccgtggc atcgcgtggt ttggcatgga gacgtcatcc 240

tgcgcgccgc acggcctgga caccatcacc ctcgcgggtg gcatgcagca catcaagcag 300

ctgggattca cgaccgtgcg gctgccgttc tcgaaccagt gcctcgcggc atctggcgtc 360

acgggtgtcg atgcggaccc atcgcttgcc ggtctcacac cgctgcaggt catggatcac 420

gtcgtggctt cggcgaaggc cgccggactt gacgtgatcc tcgaccagca ccggccggac 480

tcgggcggcc agtccgagct ctggtacacc tcggagtacc ccgagtcacg gtggatctcc 540

gactggcgga tgctcgcgaa gcggtacgcc tccgacccca cggtcatcgg tgtcgatctc 600

cacaacgagc cgcacggggc ggcgacgtgg ggtaccgggg cagccacgac cgactggcgg 660

gcggcggccg agcggggcgg gaacgcggta ttggccgaga acccgaagct cctcgtgctc 720

gtcgagggaa tcgaccacca ggccgacgga accggcacct ggtggggcgg tgcgctggac 780

tccgcggcca ctgcatccgt gcgcttgacc gtcgcgaatc gcgtcgtcta ttccccgcac 840

gactacccct cgaccatcta cggccagccc tggttctccg catcgaatta tccgacgaat 900

cttccgggaa tctgggacgc ccactgggga tacctggcaa agaaggacat cgccccgtc 960

ctcgtgggcg agttcggtac gaa 983

<210> 69
<211> 1260
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Clavibacter michiganense endo B-glucosidase gene

<400> 69
ctcagggaac taaccggatg agcactgttt cgggcgtgag gagtgcgtgc gaaaggcgtc 60

tgtggaagtg gttttcagtg cggccggatg gcttccctac gatccttata tgacatttcg 120

ccaagttcgt gcatccttag tgcttcggct cgtccttctc cttgcgttgg tggtcggcac 180

cacgtccgcc gcattcgctg cgcctgtctc agccgccacc gtagcggggc ccgttgcggc 240

ggcctcatcg cctggatggc tgcatacggc gggcgggaag atcgtcaccg cctccggtgc 300

tccgtacacg atccgtggca tcgcttggtt tggcatggag acgtcgtcgt gcgcgccgca 360

tggcctggac accatcaccc tcgcgggcgg tatgcagcac atcaagcaga tgggggttcac 420

gaccgtgcgg ttgcccttct cgaaccagtg cctcgccgcg tccggcgtca cgggtgtcag 480

tgcggacccg tcactcgccg ggctcacgcc gctgcaggtc atggaccacg tcgtcgcgtc 540

ggcgaagagc gccggtcttg acgtgatcct cgaccagcac cggccggact cgggcggcca 600

gtctgagctc tggtacacat cgcagtatcc ggagtcgcgg tggatctccg actggaggat 660

gctcgcaaag cgctatgcag ccgaacccac cgtcatcggt gtagacctcc acaacgaacc 720

gcacggtgcg gcgacctggg gtaccggggc ggccaccact gactggcggg cagcggccga 780

gcgtggcggg aatgcggtcc tcgccgagaa cccgaacctc ctcgtgctcg tggagggcat 840

cgaccacgag gccgacggat ctggcacctg gtggggcggc gcgctcgggt tggtaggcaa 900

tgcacctgtg cggctgtcgg tcgcgaatcg cgtcgtctac tccccgcatg actacccctc 960

gaccatttac ggccagtcat ggttctccgc atcaaactat ccggcgaact tgccgggtat 1020

ttgggacgcc cactggggat acctggcgaa gaaggacatt gccccggttc tcgtgggtga 1080

gttcggtacg aagttcgaga cgacgagcga caagcagtgg ctcaacaccc tcgttggata 1140

tctgtcgagc acggggatca gctcgtcgtt ctgggccttc aacccgaata gtggcgacac 1200

cggcggtatc gtgaagtccg actgggtgac cccggagcag gcgaagctcg acgccctggc 1260

# METODOS Y MATERIALES PARA CONFERIR RESISTENCIA A LAS PESTES Y PATÓGENOS DE PLANTAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional Estadounidense Ser. No 60/621.542 presentada el 21 de octubre 2004 y la Solicitud Provisional Estadounidense No 60/657.821 presentada el 1 de marzo de 2005, las cuales están incorporadas en su totalidad en la presente memoria en su totalidad.

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

Las plagas de plantas por ej., patógenos fúngicos, bacterias, nematodos, insectos, virus, etc.) causan la mayor parte de las pérdida de alimentos y fibras y fibras en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo. Las pérdidas incluyen la producción directa o pérdidas pre-cosecha, pérdidas pos–cosecha y en el almacenamiento y la disminución de la calidad y seguridad del alimento (por ej., por la producción de micotoxinas).

Otras pérdidas resultantes de las plagas de plantas se observan en las plantas valoradas por sus propiedades estéticas, olfatorias o ecológicas.

Las plagas de plantas algunas veces se pueden controlar por la aplicación de productos químicos (por ej., fungicidas, insecticidas, nematicidas, parasiticidas), manipulación o tratamiento del microambiente o por genes para la resistencia al patógeno.

El descubrimiento e introducción de un "nuevo" gen para la resistencia frecuentemente causa el desarrollo o selección de una nueva raza de patógeno capaz de infectar alas plantas que contienen ese "nuevo" gen. Esto se ha demostrado mejor por las royas y tizones de los cultivos de cereal pero también se produce con enfermedades transmitidas por la tierra tales como mancha negra del tallo del tabaco y podredumbre de raíz y tallo de la soja, causada por *Phytophthora nicotianae* y *P. sojae*, respectivamente. Existen por lo menos dos razas de *P. nicotianae* y más de 70 razas de *P. sojae*, las cuales requieren genes o combinaciones de genes diferentes para la resistencia a la enfermedad.

El género fúngico *Phytophthora* comprende varias especies de patógenos muy destructivos que causan enfermedades graves de las plantas. Estas incluyen a tizones, males de los almácigos, cancros, podredumbres de fruta, podredumbres de raíces, marchitamientos y muchos otros síntomas que afectan a una amplia variedad de

cultivos de alimentos, fibra y aceite que incluye a palta, cacao, canola, cítricos, pimienta, papa, soja, tabaco, tomate, pina, caucho, robles, etc.

En la década pasada el fenómeno del silenciamiento génico o interferencia del ARN (ARNi) ha sido descripto y caracterizado en organismos como diversos como plantas, hongos, nematodos, hidra y seres humanos (Zamore and Haley, 2005). Se considera que es un mecanismo de defensa antiguo donde el organismo hospedante reconoce como extraño a una molécula de ARN de doble cadena y lo hidroliza. Los productos de hidrólisis resultantes son fragmentos de ARN pequeños de 21–30 nucleótidos de longitud, llamados ARN interferentes (ARNsi). Los ARNsi luego difunden o se transporta por todo el huésped, donde se hibridizan al ARNm para este gen específico y causa su hidrólisis para producir más ARNsi. Este proceso se repite cada vez que el ARNsi hibridiza a su ARNm homólogo, lo cual impide efectivamente que el ARNm sea traducido y de este modo sea "silenciada" la expresión de este gen específico.

Fire et al. (2003) describe un método de administración del ARN a un huésped donde el ARN está compuesto de las secuencias homosentido y antisentido homólogas con un gen de esta célula hospedante para silenciar el gen esta célula hospedante. US **6.506.559.**

Los resultados de van West *et al.* (1999) demostraron el silenciamiento génico internuclear en *Phytophthora infestans.* Ellos transformaron el *P. infestans* con el gen de elicitina inf1 en tales orientaciones homosentido y antisentido. Esto produjo el silenciamiento de ambos transgenes, además del gen endógeno. Por la fusión somática de una cepa transgénica silenciada y una cepa de tipo salvaje, ellos demostraron don puntos esenciales; primero, que la presencia del transgén mismo no es necesaria para mantener el estado silenciado y segundo, la participación del factor de actuación en trans capaz de transferir la señal de silenciamiento entre los núcleos, posteriormente se halló que eran los ARNsi.

Waterhouse et al. (WO9953050A1) han descripto métodos para conferir resistencia viral a una planta por la transformación de la planta con una construcción de silenciamiento génico dirigida a un gen viral de planta.

Wang et al. (US20030180945A1) describe un método de silenciamiento génico en un hongo por la provisión de un hongo con una construcción de silenciamiento génico dirigida a un gen fúngico.

En el arte ese necesita un método de resistencia de la planta que sea fácilmente adaptable a los cambios de ambiente biológico tales como una y grave enfermedad de la planta. Por ejemplo, no hubo apariciones de roya asiática de la soja en USA hasta noviembre de 2004. Se pronostica que la roya asiática causará pérdidas estimadas en 1 a 7 billón de dólares (USDA) in 2005-2006.

El arte también progresaría sustancialmente si existiera un método genético versátil para conferir resistencia a una planta frente a un espectro de hongos, insectos, nematodos, bacterias, etc.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Se proporciona en la presente invención un método y construcciones para conferir resistencia a una planta que comprende el paso de transformar una célula hospedante de planta con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido;

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizar para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido ;

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud; y

donde la secuencia antisentido es homóloga con el gen de patogenicidad de por lo menos dos plagas de especies diferentes por medio de la cual la planta es resistente a dichas dos plagas en comparación con una planta sustancialmente igual que carece del polinucleótido heterólogo .

En otra realización, la presente invención proporciona un invención un método y construcciones para conferir resistencia a una planta que comprende el paso de

transformar una célula hospedante de planta con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una primera secuencia antisentido que tiene homología con un primer gen de patogenicidad de la plaga;

(b) una segunda secuencia antisentido que tiene homología con un segundo gen de patogenicidad de la plaga;

(c) una primera secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha una primera secuencia antisentido y

(d) una segunda secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha una segunda secuencia antisentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizar para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la primera secuencia antisentido y la primera secuencia homosentido ,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizar para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la segunda secuencia antisentido y la segunda secuencia homosentido y

donde cada una de dichas primera y segunda secuencias homosentido y primera y segunda secuencia antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud.

Por consiguiente, actualmente una planta puede volverse resistente a una variedad de plagas pertenecientes a miembros iguales o diferentes seleccionados del grupo que consiste en insectos, bacterias, hongos, plantas y nematodos.

En otra realización, la presente invención proporciona un invención un método y construcciones para conferir resistencia a una planta que comprende el paso de transformar una célula hospedante de planta con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) un primer promotor operativamente unido a una secuencia antisentido donde dicha secuencia antisentido es homóloga a un gen de patogenicidad de la plaga y operativamente unida a un terminador;

(b) un segundo promotor operativamente unido a una secuencia homosentido donde dicha secuencia homosentido es sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido y operativamente unida a un terminador;

donde dicho segundo promotor es un promotor potente con respecto al primer promotor,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizar para formar una región de doble hebra entre las secuencias codificadas por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido ,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud.

En otra realización, la presente invención proporciona un método y construcciones para conferir resistencia a una planta que comprende el paso de transformar una célula hospedante de planta con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) a secuencia homosentido sustancialmente complementaria con dicha secuencia antisentido ,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizar para formar una región de doble hebra que comprende a los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido ,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud,

donde la plaga se selecciona del grupo que consiste en insectos, bacterias, hongos y nematodos y

donde el gen de patogenicidad de la plaga y la plaga se seleccionan de las que se describen en la presente memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** es el mapa genético del plásmido de transformación de plantas pCAMBIA1201 usado como ejemplo a lo largo de estas descripciones y que es el esqueleto de pVZA100, pVZA200, pVZA300 y pVZA400.

La **Figura 2** es una ilustración del inserto en el plásmido intermediario pVZA1.

La **Figura 3** es el casete de silenciamiento de pVZA100 clonado en el plásmido pVZA3 y preparado para transferirse a pCAMBIA1201.

La **Figura 4** es un autorradiograma que muestra los ARNsi aislados del tabaco transgénico y de la *Phytophthora nicotianae* transgénica. Las **Figuras 4A y 4B** muestran los resultados de la hibridación de la sonda del gen de la cutinasa con los ARNsi de las plantas de tabaco de tipo salvaje y transgénicas y *P. nicotianae,* respectivamente.

La **Figura 5** muestra las reacciones de la planta a una epidemia natural de la enfermedad del moho azul del tabaco causada por *Peronospora tabacina* en el invernadero.

La **Figura 6** muestra los brotes emergentes de los embriones de soja transgénicos.

La **Figura 7** muestra los resultados de lasota transformada con pVZA100. La Fig 7A muestra los callos de soja transformados. La Fig 7B muestra los genes GUS e higromicina fosfotransferasa detectados en los callos de soja transformados.

La **Figura 8** muestra las raíces y minitubérculos producidos en las placas de cultivo de las células de papa transformadas con pVZA100.

La **Figura 9** muestra una construcción de silenciamiento génico policistrónica capaz de silenciar genes esenciales en tres especies fúngicas diferentes que causan enfermedades graves de las sojas.

La **Figura 10** muestra construcciones de silenciamiento génico basadas en ADNr y capaces de silenciar estos genes esenciales en *Phytophthora*, en *Phakopsora* y en ambas especies.

La **Figura** muestra una planta de tabaco de tipo salvaje (A) y una planta de tabaco transgénica pVZA100 (B), susceptible y resistente a *Phytophthora nicotianae*, respectivamente.

La **Figura 12** es un autorradiograma que muestra los ARNsi aislados de una planta de tabaco transgénica (3) y de *Phytophthora nicotianae* que crece en una planta de tabaco transgénica silenciada (4).

La **Figura 13** muestra plantas de soja transgénicas resistentes a la *Phytophthora sojae*.

La **Figura 14** muestra los efectos de pVZA300 y pVZA400 sobre el crecimiento y desarrollo de la *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora sojae* transgénicas.

BREVE DESCRPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

**SEC ID NO: 1** es el cebador de PCR VZA 1F usado de acuerdo con el tema de la invención..

**SEC ID NO: 2** es el cebador de PCR VZA 2R usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO: 3** es el cebador de PCR VZA 3F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO: 4** es el cebador de PCR VZA 4R usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO: 5** es la construcción de silenciamiento pVZA100 usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO: 6** es la construcción de silenciamiento génico pVZA200 usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO: 7** es la construcción de silenciamiento génico pVZA300 usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO: 8** es la construcción de silenciamiento génico pVZA400 usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO: 9** es el cebador primario del PCR GUS usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO: 10** es el cebador reverso del PCR GUS usado de acuerdo con el tema de la invención..

**SEC ID NO: 11** es el cebador de PCR pVZA100 e higromicina fosfotransferasa usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO: 12** es el cebador de PCR pVZA100 e higromicina fosfotransferasa usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 13** es el cebador VZA 1 65R usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 14** es el cebador VZA 2 69F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 15** es el cebador VZA 3 73F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 16** es el cebador VZA 3 73F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 17** es el cebador VZA 1 65 usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 18** es el cebador VZA 6 70F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 19** es el cebador de PCR VZA 7 72F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 20** es el cebador de PCR VZA 8 79F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 21** es el cebador de PCR VZA 9 84F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 22** es el cebador de PCR VZA 10 87F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 23** es el cebador de PCR VZA 11 89F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 24** es el cebador de PCR VZA 12 90F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 25** es el cebador de PCR VZA 13 91F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 26** es el es el cebador de PCR VZA 14 81F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 27** es el es el cebador de PCR VZA 15 82F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 28** es el cebador de PCR VZA 6 83F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 29** es el cebador de PCR VZA 17 85F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 30** es el cebador de PCR VZA 18 86F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 31** es el cebador de PCR VZA 19 64R usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 32** es el cebador de PCR VZA 20 77F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 33** es el cebador de PCR VZA 21 63F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 34** es el cebador de PCR VZA 22 66R usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 35** es el cebador de PCR VZA 23 80F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 36** es el cebador de PCR VZA 24 92F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 37** es el cebador de PCR VZA 25 93F usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 38** es el cebador de PCR VZA 2R usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 39** es el cebador de PCR catepsina usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 40** es el cebador de PCR elicitina usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 41** es el cebador de PCR ADNr FP usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 42** es el cebador de PCR ADNr RP usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 43** es el marcador del gen del ARN ribosómico de *Phialophora gregata* (ADNr) usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 44** es el genotipo B del ADN marcador del gen del ARN ribosómico de *Phialophora gregata* (ADNr) (ADNr) usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 45** es el gen rpb2 parcial de la subunidad de la polimerasa II de *Sclerotinia sclerotiorum* para ARN usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 46** Es el del ARN ribosómico de *Puccinia hordei* 18S usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 47** es el gen del transportador de hexosa (*hxt2*) de la *Sclerotinia sclerotiorum* usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 48** es el ARNm de la cutinasa de *Fusarium solani pisi* usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 49** es el genoma o motivo de proteína conservado de la *Phytophthora nicotianae* usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 50** es una secuencia de ADN ribosómico hallada en el genoma de la *Phakopsora pachyrhizi* usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 51** es factor 1 alfa de elongación de la traducción de *Fusarium sambucinum* usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 52** es una secuencia del gen de elicitina hallada en el genoma de la *Phytophthora infestans* usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 53** es un gen rpb2 parcial para la subunidad de ARN polimerasa IIde *Sclerotinia sclerotiorum* usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 54** es ARNr de *Stenocarpella maydis* usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 55** es el ARN ribosómico 18S del Grupo II de Cercospora zeae-maydis usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 56** es una proteasa de la catepsina B de *Myzus persicae* usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 57** es una cisteína proteasa de *Leptinotarsa decemlineata* usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 58** es ADNr de *Verticillium dahliae* usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 59** es una secuencia parcial del ARN ribosómico 5.8S hallado en el genoma de *Peronospora berteroae* genome usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 60** es una subunidad del genoma de citocromo oxidasa de e *Meloidogyne chitwoodi* usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 61** es ARN ribosómico de *P. scribneri* usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 62** es ARN ribosómico de *Heterodera glycines* usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 63** una secuencia de ARN polimerasa II de *Magnaporthe grisea* usada de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 64** es ARNr de *Puccinia hordei* 18S usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 65** es la secuencia parcial del es ARN ribosómico de 5.8S de *Pseudoperonospora humuli* usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 66** es citocromo P450 monoxigenasas de *Botrytis cinerea* usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 67** es ARNr de *Pseudomonas syingae* usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 68** es un gen Cel A de *Clavibacter michiganense michiganense* usado de acuerdo con el tema de la invención.

**SEC ID NO. 69** es un gen de endo B-glucosidasa de *Clavibacter michiganense* usado de acuerdo con el tema de la invención.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

### Definiciones

Como se usa en la presente memoria, las siguientes definiciones se aplican:

La célula (o célula de planta hospedante) significa una célula o protoplasto de una célula de planta e incluye a células aisladas y células en una planta total, órgano de planta o un fragmento de planta. También incluye a las células no aisladas.

La región de doble hebra significa una región de un polinucleótido donde los nucleótidos son capaces de formar enlaces hidrógeno entre sí. Tales enlaces hidrógeno pueden ser intramolecular o intermoleculares (por ej., unidad de transcripción única que forma una región de doble hebra con la llamada horquilla o dos unidades de transcripción que se alinean apropiadamente por secuencias complementarias al enlace de hidrógeno). Para una región de doble hebra, de acuerdo con la presente invención, no es necesario que el 100% de los nucleótidos sea complementario y unido con enlaces hidrógeno en una región. Es simplemente necesario para que se produzca el apareamiento de bases suficiente dar al ARN un sustancial carácter de doble cadena (por ej., un punto de fusión indicador).

El gen exógeno significa un gen que no está normalmente presente en un genoma hospedante dado en la forma presente. En este aspecto, el gen por sí mismo puede ser nativo para el genoma huésped, sin embargo el gen exógeno comprenderá el gen nativo alterado por la adición o supresión de uno o más elementos regulatorios diferentes o genes adicionales.

Gen o genes quiere decir secuencias de ácido nucleico (que incluyen a ARN o ADN) que codifican la información genética para la síntesis de un ARN total, una proteína total o cualquier porción funcional del ARN total o proteína total suficiente para poseer una característica deseada.

El polinucleótido heterólogo significa cualquier polinucleótido que no se halla en una planta hospedante no transformada. Un polinucleótido no está excluido de ser un polinucleótido heterólogo por la presencia de secuencias de polinucléotidos endógenos.

Homólogo, en el contexto de las relaciones entre la secuencia antisentido y un gen de patogenicidad de la plaga (es decir, la cadena de ADN que se une a la ARN polimerasa y dirige la transcripción del ARNm del gen de patogenicidad de la plaga que es la cadena antisentido), significa que tiene la semejanza de secuencia suficiente para permitir la hibridación in vivo, in vitro, y/o ex vivo en condiciones de baja rigurosidad entre la secuencia antisentido y el ARNm del gen de patogenicidad de la plaga.

La resistencia de la célula de planta hospedante significa que una planta es menos susceptible al efecto perjudicial de una plaga de planta cuando se compara con una célula de planta hospedante no transformada con dicha construcción.

171
171

La inhibición de la expresión génica quiere decir una disminución del nivel de proteína y/o producto del ARNm de un gen blanco. Las consecuencias de la inhibición se pueden confirmar por el examen de las propiedades externas de la célula u organismo (presentada a continuación en los ejemplos) o por técnicas bioquímicas tales como hibridación en solución de ARN, protección de nucleasa, hibridación Northern, reacción en cadena de polimerasa (PCR), PCR por transcripción reversa (RT) transcripción reversa PCR (RT/PCR), monitoreo de la expresión génica con una micromatriz, unión de anticuerpo, ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA), transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), otros inmunoensayos y análisis de células activadas por fluorescencia (FACS).

El gen marcador significa un gen que imparte un fenotipo distinto a una célula que expresa el marcador y de este modo permite que tales células transformadas se distingan de las células que no contienen el gen.

Operativamente unido significa unido como parte de la misma molécula de ácido nucleico, ubicada y orientada en forma adecuada para que la transcripción sea iniciada a partir del promotor.

El gen de patogenicidad de la plaga significa cualquier gen de plaga que cumple un papel en tales efectos perjudiciales de la plaga en la planta hospedante. Los efectos perjudiciales significan, a modo de ejemplo, un efecto negativo sobre el crecimiento de la planta (números y/o tamaños de la planta), desarrollo, calidad y/o reproducción. Solo a modo de ejemplo, un gen de patogenicidad de la plaga puede ser uno que cumpla un papel en algunas de las siguientes: crecimiento, desarrollo, replicación y/o reproducción de la plaga, o invasión de plagas o infección de la planta hospedante.

Patogénico, con referencia a una plaga, quiere decir una capacidad de la plaga para causar efectos perjudiciales en una planta. La patogenicidad aumenta por cualquiera de los genes de patogenicidad de la plaga.

La plaga de la planta significa cualquier organismo vivo que es perjudicial para el crecimiento de la planta (números y/o tamaños de la planta), desarrollo, calidad, rendimiento y/o reproducción. Ejemplos no limitantes de tales plagas son insectos, hongos, nematodos, bacterias y virus.

172
172

Calidad significa cualquier aspecto de una planta que se puede considerar deseable. A modo de ejemplo no limitante, la calidad se puede referir a la apariencia, rendimiento, sabor, valor nutricional, aroma, o contenido de la planta.

Sustancialmente complementaria, con respecto a la secuencia homosentido y antisentido significa suficientemente complementaria para permitir la formación de una molécula de doble hebra.

La transformación significa un proceso de introducción de una secuencia de ADN exógena (por ej., un vector, una molécula de ADN recombinante) de una célula o protoplasto en cual se el ADN exógeno se incorpora en un comrosoma o es capaz de la replicación autónoma de manera tal que se transcribe un ARN heterólogo.

El transcripto significa un ARN codificado por ADN. En el contexto de los transcriptos homosentido y antisentido de la presente invención, tales transcriptos homosentido y antisentido pueden ser parte del mismo polinucleótido o pueden ser 2 polinucleótidos separados (es decir, cada uno tiene sus propios extremos 5' y 3').

El tratamiento de una plaga de planta significa un método para reducir, eliminar, revertir o prevenir los efectos prejudiciales de una plaga de planta en la planta.

Vector significa una molécula de ADN capaz de replicación en una célula hospedante y/o en la cual el segmento de ADN puede estar operativamente unida de modo de causar la replicación del segmento unido. Un plásmido es en ejemplo de vector.

Es esencial para las diversas realizaciones de la presente invención tratar una planta para conferir resistencia a la plaga por medio de la transformación de una célula hospedante de planta con un polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria con dicha secuencia antisentido;

donde tales secuencias homosentido y antisentido son capaces de hibridizarse entre sí para formar una región de doble hebra y donde dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud.

173
173

Sin estar aferrado a la teoría, se considera que las plantas transformadas de acuerdo con la presente invención transcriben una molécula(s) de ARN con una región homóloga y una región complementaria con el gen de patogenicidad de la plaga y donde los transcripto(s) forman una molécula de ARN de doble hebra (ARNsd). La planta reconoce al ARNsd como una sustancia extraña potencial (por ej., una sustancia de origen viral). La enzima dícer de la plata corta al ARN de doble hebra en porciones de ARN de cadena única de aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, llamados ARN interferentes cortos (ARNsi). Estos ARNsi son consumidos por las plagas invasoras que han ingresado en la planta por medio de la digestión de las células de planta (por ej.,cutina). Una vez absorbidos, los ARNsi se pueden incorporar en los complejos de silenciamiento inducidos por ARN (RISC). El complejo RISC luego puede digerir el ARNm de los genes homólogos de la plagas que limitan la capacidad de la plaga para perjudicar la planta.

En una realización, la resistencia a la plaga es conferida a una planta que comprende el paso de transformación una célula hospedante de planta con un polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido ,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizar para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido ,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud,

donde dicho gen de patogenicidad de la plaga se selecciona del grupo que consiste en cutinasas, quinasas, ARN ribosómicos, adhesinas, elicitinas y proteínas G; y

donde dicha plaga es un hongo.

En una realización, la resistencia a las plagas es conferida a una planta que comprende el paso de transformación una célula hospedante de planta con un polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizar para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido ,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud,

donde dicho gen de patogenicidad de la plaga se selecciona del grupo que consiste en quinasas, ARN ribosómicos, proteínas G, factores de muda, serina proteasas, cisteína proteasas y esterasas de hormona juvenil y

donde dicha plaga es un insecto.

En una realización, la resistencia a las plagas es conferida a una planta que comprende el paso de transformación una célula hospedante de planta con un polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) un secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizar para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud,

donde dicho gen de patogenicidad de la plaga se selecciona del grupo que consiste en quinasas, ARN ribosómicos, proteínas G, proteínas del colágeno de cutícula y catepsina proteasas y

175
175

donde dicha plaga es un nematodo.

En una realización la resistencia a las plagas es conferida a una planta que comprende el paso de transformación una célula hospedante de planta con un polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) un secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizar para formardoble que comprende los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud,

donde dicho gen de patogenicidad de la plaga se selecciona del grupo que consiste en cutinasas, enzimas de maceración, quinasas, ARN ribosómicos, adhesinas y proteínas G y

donde dicha plaga es una bacteria.

En una realización, la planta hospedante es una soja y la plaga es un miembro seleccionado del grupo que consiste en *Fusarium solani* (por ej., muerte súbita), *Sclerotinia sclerotiorum* (por ej., moho blanco), *Phialophora gregata* (por ej., podredumbre marrón del tallo), *Phakospora pachyrhizi* (por ej., roya asiática) y *Phytophthora sojae* (por ej., podredumbre de raíz y tallo).

En una realización, la planta hospedante es una planta crucífera y la plaga es *Alubgo* (por ej., roya blanca).

En una realización, la planta hospedante es tabaco la plaga es *Phytophthora* (por ej., podredumbre del tallo, podredumbre de la raíz).

En una realización, la planta hospedante es papa y l plaga es *Phytophthora* (por ej., tizón tardío).

En una realización, la planta hospedante es brócoli y la plaga es *Pythium* (por ej., mal de los almácigos).

176
176

En una realización, la planta hospedante es arveja y/o remolacha azucarera y la plaga es *Aphanomyces* (por ej., podredumbre de raíz).

En una realización, la planta hospedante es tabaco y la plaga es *Peronospora* (por ej., moho azul).

También se ha descubierto que el silenciamiento génico de la plaga de acuerdo con la presente invención, se puede conferir sobre la progenie de la plaga que nunca ha estado en contacto directo con la planta hospedante transformada.

En una realización, la invención también comprende el paso de cultivar una plaga con la célula de la planta hospedante trasformada.

En una realización, la célula de planta hospedante transformada de la presente invención se co-cultiva con una plaga.

Opcionalmente, la progenie de la plaga es menos patogénica que una célula de planta diferente de una célula planta hospedante transformada.

En una realización, una planta regenerada de una célula de planta hospedante transformada de acuerdo con la presente invención se cultiva en suelo contaminado con una plaga.

En otra realización, una planta regenerada a partir de una célula de planta hospedante transformada de acuerdo con la presente invención, se cultiva en la tierra con riesgo de contaminación con una plaga.

En otra realización, una plaga se co-cultiva con una planta regenerada a partir de una célula de planta hospedante transformada de acuerdo con la presente invención y luego se cultiva en tierra contaminada con una plaga.

En otra realización, una plaga se co-cultiva con una planta regenerada a partir de una célula de planta hospedante transformada de acuerdo con la presente invención y luego se cultiva en tierra con riesgo de contaminación con una plaga.

En una realización, una plaga se co-cultiva con una planta transformada y luego se cultiva en tierra con riesgo de contaminación con una plaga.

**Homología del gen de patogenicidad de la plaga**

También se ha descubierto que el silenciamiento génico de acuerdo con la presente invención puede conferir resistencia a un sorprendentemente amplio rango de

177
177

plagas y que no requiere identidad exacta entre una región de la secuencia homosentido y el gen infeccioso de la plaga para que la presente invención sea efectiva.

En una realización de la presente invención, el gen de patogenicidad de la plaga es un gen que provee resistencia cruzada. Tal gen de la plaga está conservado dentro del filo de la plaga e manera tal que cuando se usa con la presente invención, una planta se hace resistente a una variedad de miembros del mejor filo (es decir, resistencia cruzada). Además, los genes de patogenicidad de la plaga se pueden elegir de acuerdo con la presente invención por análisis de homología bioinformática conocida por los expertos en el arte para proveer resistencia cruzada que es resistencia cruzada de especie, cruzada de género, cruzada de familia o cruzada de orden. Por ejemplo, tal como será claro a partir de los ejemplos de la presente memoria, un gen de cutinasa es útil en las plantas para conferir resistencia a una pluralidad de especies fúngicas. El gen para ADNr es útil en las plagas de la presente invención (es decir, insectos, bacterias, hongos y nematodos). Otros ejemplos no limitantes de tales genes conservados son las quinasas, adhesinas, proteínas G, elicitinas, enzimas de maceración, ADN y ARN polimerasas, factores de elongación, factores de muda, serina proteasas, cisteína proteasas, esterasas de hormona juvenil, proteínas del colágeno de la cutícula y catepsina proteasas y otras que se exponen a continuación. En otra realización, un gen de patogenicidad de la plaga se selecciona por carecer de suficiente homología con un gen de planta para causar efectos perjudiciales en e l polinucleótido heterólogo de la planta hospedante (por ej., impedir el silenciamiento de un gen de planta). Por ejemplo, en una realización, la homología entre la secuencia antisentido y el gen de patogenicidad de la plaga es de menos de aproximadamente 70%.

En una realización, la secuencia antisentido es homóloga al gen de patogenicidad de la plaga en por lo menos aproximadamente 70%.

Opcionalmente, la homología es por lo menos de aproximadamente 75%.

Opcionalmente, la homología es por lo menos de aproximadamente 80%.

Opcionalmente, la homología es por lo menos de aproximadamente 85%.

Opcionalmente, la homología es por lo menos de aproximadamente 90%.

Opcionalmente, la homología es por lo menos de aproximadamente 95%.

En una realización, un transcripto de la secuencia homosentido es homóloga a un transcripto del gen de patogenicidad de la plaga (por ej., ARNm del gen de patogenicidad de la plaga) en por lo menos aproximadamente 70%.

Opcionalmente, la homología es por lo menos aproximadamente 75%.

Opcionalmente, la homología es por lo menos aproximadamente 80%.

Opcionalmente, la homología es por lo menos aproximadamente 85%.

Opcionalmente, la homología es por lo menos aproximadamente 90%.

Opcionalmente, la homología es por lo menos aproximadamente 95%.

La homología mencionada anteriormente puede opcionalmente prolongarse en una extensión de por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos, o por lo menos aproximadamente 25 nucleótidos, o por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos o por lo menos aproximadamente 100 nucleótidos.

Opcionalmente, se puede demostrar la homología entre la secuencia antisentido y el gen de patogenicidad de la plaga (es decir, la cadena de ADN que se une a la ARN polimerasa y dirige la transcripción del ARNm del gen de patogenicidad de la plaga) en cualquiera de por lo menos tres maneras.

(1) hibridación entre la secuencia antisentido y la región correspondiente de la cadena homosentido del gen de la plaga.

(2) hibridación entre el transcripto antisentido y la región correspondiente del gen de patogenicidad de la plaga .

(3) hibridación entre el transcripto de un ADN complementario de la secuencia antisentido (es decir, ADNc antisentido) y una la región correspondiente región del ARNm del gen de patogenicidad de la plaga.

La hibridación, expuesta anteriormente, se puede demostrar en condiciones de baja rigurosidad. Opcionalmente, las condiciones son unas de moderada a alta rigurosidad por técnicas conocidas en el arte, como describe, por ejemplo, en Keller, G.H., M.M. Manak (1987) ADN Probes, Stockton Press, New York, NY, pp. 169-170.

Los ejemplos de condiciones de de moderada a alta rigurosidad se proporcionan en la presente memoria. Específicamente, la hibridación del ADN inmovilizado en transferencia Northern con sondas específicas de genes marcadas con $^{32}P$ se realiza

mediante métodos estándares (Maniatis *et al.*). En general, la hibridación y posteriores lavados se llevan a cabo en condiciones de moderada a alta rigurosidad que permite la detección de secuencias blanco con homología con las secuencias ejemplificadas en la presente memoria. Para sondas del gen de ADN de doble hebra, la hibridación se realiza durante toda la noche a 20-25 °C por debajo de la temperatura de fusión (Tm) del híbrido de ADN en 6X SSPE, solución de Denhardt 5X, SDS 0,1%, 0.1 mg/ml de ADN desnaturalizado. La temperatura de fusión se describe por la siguiente fórmula de Beltz *et al.* (1983): Tm=81,5 °C+16.6 Log[Na+]+0.41(%G+C)-0.61(% formamida)-600/longitud del duplex en pares de bases.

Los lavados típicamente se realizan de la siguiente manera:

(1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en 1X SSPE, 0,1% de SDS (lavado de baja rigurosidad).

(2) Una vez a Tm-20 °C durante 15 minutos en SSPE 0,2X, SDS 0,1% (lavado de moderada rigurosidad).

Para las sondas de oligonucleótidos, la hibridación se realiza durante toda la noche a 10-20 °C por debajo de la temperatura de fusión (Tm) del híbrido de SSPE 6X, solución de Denhardt 5X, SDS 0,1%, 0,1 mg/ml del ADN desnaturalizado. La Tm para las sondas de oligonucleótidos se determinó por la siguiente fórmula de Suggs *et al.* (1981): Tm (°C)=2 (número de pares de bases T/A) +4(número de pares de bases G/C).

Los lavados típicamente se realizan de la siguiente manera:

(1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos SSPE 1X, SDS 0,1% (lavado de rigurosidad baja).

(2) Una vez a la temperatura de hibridación durante 15 minutos en SSPE 1X, SDS 0,1% (lavado de rigurosidad moderada).

En general, la sal y/o temperatura se puede alterar para cambiar la rigurosidad. Con un fragmento de ADN marcado mayor de aproximadamente 70 o más bases de longitud, se pueden usar las siguientes condiciones:

Baja: 1 o SSPE 2X, temperatura ambiente

Baja: 1 o SSPE 2X, 42° C

Moderada: 0,2X o 1X SSPE, 65° C

180
180

Alta: 0,1X SSPE, 65° C.

La formación del duplex y estabilidad dependen de la complementariedad sustancial entre las dos cadenas de un híbrido y como se indicó anteriormente se puede tolerar un cierto grado de mala apareamientos. En consecuencia, las secuencias polinucleotídicas útiles del tema de invención incluyen a las mutaciones (tanto únicas como múltiples), supresiones e inserciones de las secuencias descriptas y sus combinaciones, donde dichas mutaciones, inserciones y supresiones permiten la formación de híbridos estables con un polinucléotido blanco de interés. Las mutaciones, inserciones y supresiones se pueden producir en una secuencia polinucleotídica dada mediante los métodos estándares conocidos en el arte. Otros métodos pueden ser conocidos en el futuro.

Las variantes de las mutaciones, inserciones y supresiones de las secuencias polinucleotídicas de la invención se pueden usar de la misma manera que las secuencias polinucleotídicas ejemplificadas siempre que las variantes tengan una semejanza de secuencia sustancial con la secuencia original. Como se usa en la presente memoria, la semejanza de secuencia sustancial se refiere al grado de semejanza de nucleótidos que es suficiente para permitir que el polinucleótido de la variante funcione con la misma capacidad que la secuencia original. Con preferencia, esta semejanza es mayor de 75%; con más preferencia esta semejanza es mayor de 90%; y con máxima preferencia, esta semejanza es mayor de 95%. El grado de semejanza que se necesita para que la variante actúe con su capacidad esperada dependerá del uso esperado de la secuencia. Es bien conocido en la experiencia de una persona entrenada en este arte la preparación de mutaciones de mutaciones, inserciones y supresiones que se diseñan para mejorar la función de la secuencia o aparte de eso proporciona una ventaja metodológica.

**Vectores**

Los expertos en el arte podrán construir vectores de la presente invención (que incluyen a los basados en el ADN desnudo) y protocolos de diseño para la expresión de gen recombinante. Para detalles adicionales ver, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Tales técnicas y protocolos aplicables para la manipulación de ácidos nucleicos,

por ejemplo la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción del ADN en las células y expresión génica y análisis de proteínas, se describen en detalle en Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

Los procedimientos específicos y vectores previamente usados con gran éxito sobre plantas se describen en Bevan, Nucl. Acids Res. (1984) 12, 8711-8721), y Guerineau and Mullineaux, (1993). Plant transformation and expression vectors. In: Plant Molecular Biology Labfax (Croy RRD ed). Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148.

Los vectores de acuerdo con la presente invención se pueden proporcionar aislados y/o purificados (es decir, de su ambiente natural), en forma sustancialmente pura u homogénea, o libre o sustancialmente libre de otros ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden ser total o parcialmente sintéticos.

**Planta hospedantes**

La presente invención se puede usar para la transformación de cualquier planta, que incluye pero sin limitación a, maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa ssp.*), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*), maní (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Cofea ssp.*), coco (*Cocos nucifera*), ananá (*Ananas comosus*), cítricos (*Citrus spp.*), cacao (*Theobroma cacao*), té (Camellia sinensis), banana (Musa spp.), palta (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (Mangifera *indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), cajú (*Anacardium occidental*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), avena, cebada, hortalizas, ornamentales y coníferas.

Opcionalmente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivos (por ejemplo, cereales y legumbres, maíz, trigo, papas, tapioca, arroz, sorgo, mijo, mandioca, cebada, arveja y otra raíces, tubérculos o semillas de cultivo. Las cultivos de

semillas importantes de la presente invención son nabo oleaginoso, remolacha azucarera, maíz, girasol, soja y sorgo. Las plantas hortícolas en las cuales se puede aplicar la presente invención puede incluir lechuga, endivia y hortalizas brassica que incluyen repollo, brócoli y coliflor y claveles, geranios, petunias y begonias. La presente invención se puede aplicar a tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, frutilla, girasol, tomate, pimienta, crisantemo, álamo, eucaliptos y pino.

Opcionalmente, las plantas de la presente invención incluyen a las semillas de grano, tales como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno, etc.

Opcionalmente, las plantas de la presente invención incluyen a las plantas de semillas oleaginosas. Las plantas de semillas oleaginosas incluyen canola, algodón, soja, cártamo, girasol, *Brassica*, maíz, alfalfa, palma, coco, etc.

Opcionalmente, las plantas de la presente invención incluyen a las plantas leguminosas. Las plantas leguminosas incluyen a los porotos y arvejas. Los porotos incluyen guar, algarroba, fenogreco, soja, habichuelas, frijol, frijol mungo, haba de lima, habas, lentejas, garbanzo, etc.

Las plantas hospedantes útiles de la presente invención son cultivos en surco y cultivos al voleo. Los ejemplos no limitantes de cultivos en surcos útiles son maíz, soja, algodón, amaranto, hortalizas, arroz, sorgo, trigo, milo, cebada, girasol, trigo candeal y avenas.

Los ejemplos no limitantes de cultivos al voleo son girasol, mijo, arroz, sorgo, trigo, milo, cebada, trigo candeal y avenas.

Las planta hospedantes útiles de la presente invención son monocotiledóneas y dicotiledones.

Los ejemplos no limitantes de monocotiledóneas son arroz, maíz, trigo, palmeras, césped, cebada y avenas.

Los ejemplos no limitantes de plantas dicotiledóneas son soja, algodón, alfalfa, canola, lino, tomate, remolacha azucarera, girasol, papa, tabaco, maíz, trigo, arroz, lechuga, apio, pepino, zanahoria, coliflor, uva y céspedes.

Las plantas hospedantes útiles de la presente invención incluyen a las plantas cultivadas para beneficios estéticos u olfativos. Los ejemplos o limitantes incluyen las

plantas con floración, árboles, pastos, plantas de sombra y plantas ornamentales con flores y sin flores.

Las plantas hospedantes útiles de la presente invención incluyen a las plantas cultivadas por su valor nutricional.

**Tipos de células hospedantes**

Un experto en el arte reconocerá la amplia variedad de células hospedantes que se pueden poner en contacto con los polinucleótidos heterólogos de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos no limitantes de tales células son las d los tejidos embriogénicos, tipos de tejidos del callo I, II y III, hipocótilo, meristemo, tejido de raíz, tejidos para la expresión en floema y similares.

Las células de la planta hospedante opcionalmente se pueden enriquecer con células con mayor potencial para transformarse y/o mayor potencial para regenerar plantas maduras. La selección manual de las células de la planta hospedante, por ej., por la selección de células embriogénicas de la superficie del callo de tipo II, es un medio que se puede usar para enriquecer las células de la r planta hospedante antes del cultivo (sea cultivada en medio sólido o en suspensión). Opcionalmente, las células se pueden seleccionar de las localizadas en al superficie de un agrupamiento de células y también puede ser identificable por su carencia de diferenciación, su tamaño y citoplasma denso. En una realización, las células de la planta hospedante son menos diferenciadas o todavía no están comprometidas en la diferenciación. De este modo, en una realización, las células se identifican y seleccionan a partir de estas células que presenten un citoplasma denso, relativamente no vacuolado con un núcleo superior en al relación con el citoplasama (por ej., determinado por observaciones citológicos), pequeño en tamaño (por ej., 10-20 µm), y capaz de formación de divisiones sostenidas y proembrión somático.

Opcionalmente, las células de la planta hospedante se identifican mediante el uso de colorantes, tales como azul de Evan, el cual está excluido por las células con membranas relativamente no permeables, tales como las células embriogénicas y tomada por las células relativamente diferenciadas tales como las células similares a raíces y células serpentiformes (así llamadas debido a su apariencia semejante a una serpiente).

184

Opcionalmente, las células de la planta hospedante se identifican mediante el uso de marcadores de isozimas de las células embriogénicas, tales como glutamato deshidrogenasa, que se peuden detectar por colorantes citoquímicos (Fransz et al., 1989). Un experto en el arte reconocerá que los marcadores de isozima tales como glutamato deshidrogenasa pueden conducir a algún grado de falsos positivos a partir de las células no embriogénicas tales como células rooty que no obstante tiene una relativamente alta actividad metabólica.

Casi todos los tejidos de plantas se pueden transformar durante la diferenciación mediante técnicas apropiadas descriptas en la presente memoria. Los blancos celulares recipientes incluyen pero sin limitación a células del meristemo, del callo Tipo I, Tipo II y Tipo III, embriones inmaduros y células gaméticas tales como células de las microsporas, polen, espermatozoides y huevo. Está contemplado que cualquier célula proveniente de una tal planta fértil que se puede regenerar es útil como célula recipiente. El callo Tipo I, Tipo II, y Tipo III se puede iniciar a partir de las fuentes de tejido que incluyen pero sin limitación a embriones inmaduros, inflorescencias inmaduras, meristemos apicales de plántulas, microsporas y similares.

Estas células que son capaces de proliferar como callo también son células recipientes para la transformación genética. La presente invención proporciona técnicas para la transformación de embriones inmaduros y posteriormente la regeneración de plantas transgénicas fértiles. La transformación directa de los embriones inmaduros obvia la necesidad de un desarrollo a largo plazo de cultivos de células recipientes. El polen, además de sus células precursoras, las microsporas, puede ser capaz de funcionar como células recipientes para la transformación genética o como vectores para transportar ADN extraño para la incorporación durante la fertilización. La transformación del polen directo obviaría la necesidad del cultivo celular.

Las células meristemáticas (es decir, células de plantas capaces de la división celular continua y caracterizadas por una apariencia citológica no diferenciada, que se hallan normalmente en puntos o tejidos de crecimiento de las plantas tales como puntas de raíces, ápices del tallo, yemas laterales, etc.) pueden representar otro tipo de célula de planta recipiente. Debido a su crecimiento indiferenciado y capacidad para la diferenciación y totipotencia de órganos, una célula meristemática única se podría

recuperar como una planta transformada total. En efecto, se ha propuesto que los cultivos de suspensiones embriogénicas s pueden ser un sistema celular meristemático in Vitro, que retiene una capacidad para la división de células continua en un estado indiferenciado, controlado por el medio ambiente.

**Plagas**

Las plagas de plantas útiles de la presente invención (es decir, se pueden volver no patogénicas de acuerdo con la presente invención), incluyen hongos, nematodos, insectos, bacterias y plantas parasitarias tales como striga, cuscuta y muérdago.

Ejemplos no limitantes de tales hongos útiles incluyen a los expuestos en la Tabla 4.

Ejemplos no limitantes de tales nematodos hongos útiles incluyen a los expuestos en la Tabla 3.

Ejemplos no limitantes de tales insectos útiles incluyen a los pulgones, saltamontes, chicharrritas, cochinilla harinosas y *Lepidoptera* larvae.

Las plagas de plantas tratadas útilmente por la presente invención incluyen a las bacterias. Ejemplos no limitantes de tales bacterias se muestran en la Tabla 1.

Las plagas de plantas tratadas útilmente por la presente invención incluyen a las royas. Ejemplos no limitantes de tales royas se muestran en la Tabla 5.

Las plagas de plantas tratadas útilmente por la presente invención incluyen al mildiú. Ejemplos no limitantes de tales se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 1 Plagas – Bacterias**

| Enfermedad | Agente causante |
|---|---|
| Tizón de la hoja y podredumbre del tallo bacteriano | *Pseudomonas avenae subsp.avenae* |
| Mancha de la hoja bacteriana | *Xanthomonas campestris pv.holcicola* |
| Podredumbre del tallo bacteriano | *Enterobacter dissolvens = Erwinia dissolvens* |
| Podredumbre de tallo y | *Erwinia carotovora subsp. carotovora, Erwinia* |

| | |
|---|---|
| punta bacteriano | *chrysanthemi pv. Zeae* |
| Estriado bacteriano | *Pseudomonas andropogonis* |
| Mancha chocolate | *Pseudomonas syringae pv. Coronafaciens* |
| Tizón y marchitamiento bacteriano de Goss (hoja pecosa y marchita) | *Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis = Corynebacterium michiganense pv. Nebraskense* |
| mancha Holcus | *Pseudomonas syringae pv. Syringae* |
| Vaina de hoja púrpura | *Bacterias Hemiparasitic + (ver abajo Hongos)* |
| Tizón de podredumbre de plántula en semilla | *Bacillus subtilis* |
| Enfermedad de Stewart (marchitamiento bacteriano) | *Pantoea stewartii = Erwinia stewartii* |
| Achaparramiento del maíz (Achaparramiento Mesa Central o Rio Grande) | *achapparramiento, stunt, Spiroplasma kunkelii* |

**Tabla 2 Plagas - mildiús**

| Enfermedad | Agente causante |
|---|---|
| Mildiú rayado café | *Sclerophthora rayssiae var. zeae* |
| Mildiú de la punta loca | *Sclerophthora macrospora = S. macrospore* |
| Mildiú de la espiga verde | *Sclerospora graminicola* |
| Mildiú de Java | *Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis* |
| Mildiú filipino | *Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis* |
| Mildiú del sorgo | *Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi* |
| Mildiú espontáneo | *Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea* |
| Mildiú de la caña de | *Peronosclerospora sacchari = Sclerospora* |

| | |
|---|---|
| azúcar | *sacchari* |
| Podredumbre de espiga (podredumbre de mazorca, grano y tallo) | *Nigrospora oryzae (teleomorfo: Khuskia oryzae)* |
| Podredumbre de las espigas, menor | *Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydicus, Rhizopus microsporus, R. stolonifer = R. nigricans, Scopulariopsis brumptii* |
| Ergot (diente del caballo) | *Claviceps gigantea (anamorfo: Sphacelia sp.)* |
| Mancha ocular | *Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae* |
| Podredumbre de espiga y mazorcas por fusarios | *Fusarium subglutinans = F. moniliforme var. subglutinans* |
| Podredumbre del grano, raíz y tallo por fusario y tizón de las plántulas | *Fusarium moniliforme teleomorfo: Gibberella fujikuroi)* |
| Podredumbre del tallo por fusarios, podredumbre de la raíz de la plántula | *Fusarium avenaceum (teleomorfo: Gibberella avenacea)* |
| Podredumbre de la espiga y tallos por Gibberella | *Gibberella zeae (anamorfo: Fusarium graminearum)* |
| Podredumbre gris de la espiga | *Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorfo: Macrophoma zeae)* |
| Mancha gris de la hoja | *Cercospora leaf spot) Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis* |
| Podredumbre radicular por Helminthosporium | *Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorfo: Setosphaeria* |
| Podredumbre de la espiga por Hormodendrum | *(Cladosporium Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides,rot), C. herbarum (teleomorfo: Mycosphaerella tassiana)* |

| | |
|---|---|
| Mancha foliar por Hyalothyridium | *Hyalothyridium maydis* |
| Marchitamiento tardío | *Cephalosporium maydis* |
| Manchas foliares, menor | *Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorfo: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorfo: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorfo: Setosphaeria prolata) Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorfo: Scolecosporiella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina* |
| Tizón foliar del maíz del Norte | *Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Setosphaeria turcica* |
| Mancha foliar del maíz del Norte | *Cochliobolus carbonum* |
| Podredumbre de la espiga por Helminthosporium (raza 1) | *Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum* |
| Podredumbre de la espiga por Penicillium (ojo azul, moho azul) | *Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum* |
| Podredumbre del tallo y podredumbrede raíz por Phaeocytostroma | *Phaeocytostroma ambiguum, Phaeocytosporella zeae* |
| Mancha foliar por Phaeosphaeria | *Phaeosphaeria maydis, Sphaerulina maydis* |
| Podredumbre de la espiga por Physalospora | *Botryosphaeria Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola, (anamorfo: Diplodia frumenti)* |

| | |
|---|---|
| Vaina foliar púrpura | *Bacterias hemiparasitarias y hongos* |
| Podredumbre del tallo y podredumbre de raíz por Pyrenochaeta | *Phoma terrestris, Pyrenochaeta terrestris* |
| Podredumbre de raíz por Pythium | *Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola* |
| Podredumbre del tallo por Pythium | *Pythium aphanidermatum = P. butleri L.* |
| Enfermedad del gran rojo (moho de la espiga, podredumbre de semilla y hoja) | *Epicoccum nigrum* |
| Podredumbre de la espiga por Rhizoctonia | *Rhizoctonia zeae (teleomorfo: Waitea circinata)* |
| Podredumbre de la raíz y podredumbre del tallo por Rhizoctonia | *Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae* |
| Podredumbre de las raíces, menor | *Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorfo: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorfo: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, F. cyanogena, (anamorfo: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus* |
| Mancha foliar por Rostratum (enfermedad foliar, podredumbre de la espiga y tallo ) | *Setosphaeria rostrata,Helminthosporium (anamorfo: Exserohilum rostratum = Helminthosporium rostratum)* |
| Roya, grano común | *Puccinia sorghi* |
| Roya, grano del sur | *Puccinia polysora* |
| Roya, grano tropical | *Physopella pallescens, P. zeae = Angiopsora zeae* |

| | |
|---|---|
| Podredumbre de la espiga por Sclerotium (tizón del sur) | *Sclerotium rolfsii (teleomorfo: Athelia rolfsii)* |
| Tizón de la plántula podrida de semilla | *Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicillatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zeae (anamorfo: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.* |
| Mancha foliar de Selenophoma | *Selenophoma sp.* |
| Podredumbre de la vaina | *Gaeumannomyces graminis* |
| Podredumbre de la cáscara | *Myrothecium gramineum* |
| Moho del ensilaje | *Monascus purpureus, M. rubber* |
| Carbón, común | *Ustilago zeae = U. maydis* |
| Carbón, falso | *Ustilaginoidea virens* |
| Carbón, principal | *Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holci-sorghi* |
| Tizón de la hoja del maíz y podredumbre del tallo | *Cochliobolus heterostrophus(anamorfo: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)* |
| Mancha foliar del sur | *Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora* |
| Podredumbre de los tallos, menor | *Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorfo: Nectria haematococca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopographus zeae, Spicaria sp.* |

| | |
|---|---|
| Podredumbres del almacenamiento | *Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi* |
| Mancha del asfalto | *Phyllachora maydis* |
| Podredumbre de la espiga y podredumbre de la raíz por Trichoderma | *Trichoderma viride = T. lignorum teleomorfo: Hypocrea sp.* |
| Podredumbre blanca de la espiga, podredumbre de la raíz y tallo | *Stenocarpella maydis = Diplodia zeae* |
| | |
| Tizón foliar amarillo | *Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorfo: Mycosphaerella zeae-maydis)* |
| Mancha foliar zonada | *Gloeccercospora sorghi* |

**Tabla 3 Plagas –Nematodos parasitarios**

| Enfermedad | Patógeno |
|---|---|
| Anguilula | *Dolichodorus spp., D. heterocephalus* |
| Bulbo y tallo (Europe) | *Ditylenchus dipsaci* |
| Barrenador | *Radopholus similes* |
| Quiste | *Heterodera avenae, H. zeae, Punctodera chalcoensis* |
| Daga | *Xiphinema spp., X. americanum, X. Mediterraneum* |
| Falso nematodo del nudo | *Nacobbus dorsalis* |
| Lanza, Columbia | *Hoplolaimus Columbus* |
| Lanza | *Hoplolaimus spp., H. galeatus* |
| Lesiones | *Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zeae* |
| Aguja | *Longidorus spp., L. breviannulatus* |
| Anillado | *Criconemella spp., C. ornata* |
| Nudo falso | *Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M.* |

| | |
|---|---|
| | *incognita, M. javanica* |
| Espiral | *Helicotylenchus spp.* |
| Aguijón | *Belonolaimus spp., B. longicaudatus* |
| Raíces cortas | *Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.* |
| Achaparramiento | *Tylenchorhynchus dubius* |

[0001]

**Tabla 4 Plagas – Hongos**

| Enfermedad | Plaga fúngica |
|---|---|
| Antracnosis con tizón foliar y antracnosis con podredumbre del tallo | *Colletotrichum graminicola* (teleomorfo: *Glomerella graminicola), Glomerella tucumanensis* (anamorfo: *Glomerella falcatum)* |
| Podredumbre de espiga y grano por Aspergillus | *Aspergillus flavus* |
| Mancha a bandas de la hoja y vaina | *Rhizoctonia solani = Rhizoctonia microsclerotia* (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris)* |
| Enfermedad de necrosis vascular | *Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium* |
| Podredumbre negra del grano | *Lasiodiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae* |
| Borde blanco | *Marasmiellus sp.* |
| Mancha marrón (mancha negra, podredumbre del tallo ) | *Physoderma maydis* |
| Podredumbre del grano por Cephalosporium | *Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium* |
| Podredumbre carbonosa | *Macrophomina phaseolina* |
| Podredumbre de la raíz por Corticium | *Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii* |
| Mancha foliar de Curvularia | *Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans* |

| | |
|---|---|
| | (teleomorfo: *Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia* (teleomorfo: *Cochliobolus intermedius), Curvularia lunata* (teleomorfo: *Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens* (teleomorfo: *Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuberculata* (teleomorfo: *Cochliobolus tuberculatus)* |
| Mancha foliar de Didymella | *Didymella exitalis* |
| Podredumbre de la espiga y podredumbre del tallo de Diplodia | *Diplodia frumenti* (teleomorfo: *Botryosphaeria festucae)* |
| Podredumbre de la espiga, podredumbre del tallo, podredumbre de semilla y tizón de plántulas por Diplodia | *Diplodia maydis = Stenocarpella maydis* |
| Mancha foliar o rayado foliar por Diplodia | *Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospore* |

**Tabla 5 Plagas – Royas**

| Planta hospedante | Nombre común de la enfermedad | Especies de roya |
|---|---|---|
| Cebada | Roya corona | *Puccinia coronate* |
| | Roya de la hoja | *Puccinia hordei* |
| | Roya del tallo | *Puccinia graminis* |
| | Roya rayada (amarilla) | *Puccinia striiformis* |
| Maíz | Roya común | *Puccinia sorghi* |
| | Roya del sur | *Puccinia polysora* |
| | Roya tropical | *Physopella pallescens, P. zeae = Angiopsora zeae* |
| Avenas | Roya corona | *Puccinia coronata* |
| | Roya del tallo | *Puccinia graminis* |
| Centeno | Roya del tallo | *Puccinia gramminis. = P. graminis f. sp. secalis* |
| | Roya de la hoja (marrón) | *Puccinia recondita* (anamorph: *Aecidium clematidis)* |
| Sorgo | Roya | *Puccinia purpurea* |
| Caña de | Roya común | *Puccinia melanocephala.= P.* |

| | | |
|---|---|---|
| azúcar | | *erianthi* |
| | Roya naranja | *Puccinia kuehnii* |
| Trigo | Roya de la hoja (marrón) | *Puccinia triticina.= P. Recondita f. Sp. tritici = P. tritici-duri* |
| | Roya del tallo (negra) | *Puccinia gramminis = P. graminis f. sp. tritici* |
| | Roya rayada (amarilla) | *Puccinia striiformis* (anamorph: *P. uredoglumarum)* |
| Manzana | Roya del espino Americano | *Gymnosporangium globosum* |
| | Roya de cedro manzana | *Gymnosporangium juniperi-virginianae* |
| | Roya de la manzana japonesa | *Gymnosporangium yamadae miyabe ex yamada* |
| | Roya de la pera de la costa del pacífico | *Gymnosporangium libocedri* |
| | Roya del membrillo | *Gymnosporangium clavipes* |
| Espárrago | Roya | *Puccinia asparagi* |
| Banana | Roya de la hoja | *Uredo musae, uromyces musae* |
| Poroto | Roya | *Uromyces appendiculatus* |
| Remolacha | Roya de la plántula. | *Puccinia subnitens* |
| Zanahoria | Roya | *Aecidium foeniculiuromyces graminis, Uromyces lineolatus subsp. nearcticus* |
| Garbanzo | Roya | *Uromyces ciceris-arietini, Uromyces striatus* |
| Café | Roya (naranja o roya de la hoja) | *Hemileia vastatrix* |
| | Roya (harinosa o roya gris) | *Hemileia coffeicola* |
| Algodón | Roya del algodón | *Puccinia schedonnardi* |
| | Roya del sudoeste | *Puccinia cacabata* |
| | Roya tropical | *Phakopsora gossypii* |
| Eucalipto | Roya | *Puccini apsidii* |
| Lino | Roya | *Melampsora lini* |
| Uva | Roya | *Physopella ampelopsidis* |
| Lechuga | Roya | *Puccinia dioicae = P. extensicola var. hieraciata* |
| Espárrago | Roya del espárrago | *Puccinia asparagi* |
| Cebolla | Roya de la cebolla | *Puccinia allii* |
| Arveja | Roya | *Uromyces fabae* |
| Maní | Roya | *Puccinia arachidis* |
| Pera | Roya del espino Americano | *Gymnosporangium globosum* |
| | Roya de la pera de Kern | *Gymnosporangium kernianum* |
| | Roya de la pera de la costa del pacifico | *Gymnosporangium libocedri* |
| | Roya de las espalderas de pera | *Gymnosporangium fuscum* |

| | | |
|---|---|---|
| | Roya de la pera Mountain | *Gymnosporangium nelsonii* |
| Álamo | Roya del álamo europeo | *Melampsora larici-populinakle* |
| | Toya de la hoja americana | *Melampsora medusae* |
| Papa | Roya común | *Puccinia pittierianap* |
| | Roya deformante | *Aecidium cantensis* |
| Trébol rojo | Roya | *Uromyces trifolii-repentis* |
| Soja | Roya | *Phakopsora pachyrhizi* |
| Frutilla | Roya de la hoja | *Phragmidium potentillae* = *Frommea obtusa* |
| Girasol | Roya | *Puccinia helianthi, P. xanthii, Uromyces junci* |
| Batata | Roya roja | *Coleosporium ipomoeae* |

**Genes de patogenicidad de las plagas**

El profesional experto puede identificar fácilmente los genes de las plagas de la presente invención. Tal gen podría ser cualquier gen de la plaga que cumple una función directa o indirecta en tales efectos perjudiciales de las plagas en una planta hospedante. Solo a modo de ejemplo, tal gen puede ser uno que cumple un papel en el crecimiento, desarrollo, replicación y reproducción, e invasión o infeccón de la plaga.

En una realización, la planta hospedante no contiene un gen que sea más de aproximadamente 70% homólogo al gen de patogenicidad de la plaga.

Opcionalmente, la homología no es más de aproximadamente 60%.

Opcionalmente, la homología no es más de aproximadamente 50%.

En una realización, la planta hospedante no contiene un gen que contiene una extensión de 25 nucleótidos que sea más de aproximadamente 70% homólogo al gen de patogenicidad de la plaga.

En una realización, la planta hospedante no contiene un gen que contiene una extensión de 25 nucleótidos que sea más de aproximadamente 60% homólogo al gen de patogenicidad de la plaga.

En una realización, la planta hospedante no contiene un gen que contiene una extensión de 25 nucleótidos que sea más de aproximadamente 50% homólogo al gen de patogenicidad de la plaga .

En una realización, la planta hospedante no contiene un gen que contiene una extensión de 25 nucleótidos que sea más de aproximadamente 70% homólogo al gen de patogenicidad de la plaga.

En una realización, la planta hospedante no contiene más de un gen que contiene una extensión de 25 nucleótidos que sea más de aproximadamente 60% homólogo al gen de patogenicidad de la plaga.

En una realización, la planta hospedante no contiene más de un gen que contiene una extensión de 25 nucleótidos que sea más de aproximadamente 50% homólogo al gen de patogenicidad de la plaga.

**Tabla 6 Plagas, genes de patogenicidad de plagas y plantas hospedantes**

| Plaga o grupo patógeno | Gen de patogenicidad de la plaga | Plantas hospedantes |
|---|---|---|
| Hongos | Cutinasas | Todas |
| | Quinasas | Todas |
| | ARN ribosómicos | Todas |
| | Adhesinas | Todas |
| | Proteínas G | Todas |
| | Elicitinas | Todas |
| Bacterias | Cutinasas | Todas |
| | Enzimas de maceración | Todas |
| | Quinasas | Todas |
| | ARN ribosómicos | Todas |
| | Adhesinas | Todas |
| | Proteínas G | Todas |
| Insectos | Quinasas | Todas |
| | ARN ribosómicos | Todas |
| | Proteínas G | Todas |
| | Factores de muda | Todas |
| | Serina proteasas | Todas |
| | Cisteína proteasas | Todas |
| | Esterasa de hormona juvenil | Todas |
| Nematodos | Quinasas | Todas |
| | ARN ribosómicos | Todas |
| | Proteínas G | Todas |
| | Proteínas del colágeno de la cutícula | Todas |
| | Catepsina proteasas | Todas |

197
197

A modo de ejemplo, la cutinasa es un gen útil de acuerdo con la presente invención. Cuando una hifa fúngica invade una célula de planta y absorbe los nutrientes, absorbe ARNsis de la planta y silencia la cutinasa esencial y contitutiva del hongo.

Solo a modo de ejemplo, tal gen puede ser uno que cumpla una función en el crecimiento, desarrollo, replicación y reproducción e invasión o infección de la plaga. Otros ejemplos no limitantes incluyen a los de la Tabla 6.

**Secuencias homosentido (y antisentido)**

Las secuencias homosentido y antisentido de acuerdo con la presente invención pueden ser cualquier secuencia con homología con una cadena homosentido y antisentido (respectivamente) del gen de patogenicidad de la plaga.

Las secuencias homosentido y antisentido pueden estar en la misma cadena del ADN o en diferentes cadenas de ADN. Cuando las secuencias homosentido y antisentido están en la misma cadena de ADN, la transcripción de estas secuencias puede ser conducida por el mismo promotor o promotores diferentes (por ej. diferentes copias del mismo promotor o diferentes promotores). Cuando las secuencias homosentido y antisentido están en cadenas diferentes de de ADN, la transcripción de estas secuencias es conducida por promotores diferentes.

Las secuencias homosentido y antisentido se pueden disponer en el ADN como ADN duplex complementario o las secuencias pueden estar en regiones diferentes del ADN (es decir, sin formar un ADN duplez entre sí).

Cada una de las secuencias homosentido y antisentido comprende por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos. Opcionalmente, cada secuencia comprende por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos, opcionalmente por lo menos aproximadamente 100 nucleótidos, opcionalmente por lo menos aproximadamente 150 nucleótidos, opcionalmente por lo menos aproximadamente 250 polinucleótidos, opcionalmente por lo menos aproximadamente 500 nucleótidos, opcionalmente por lo menos aproximadamente 600 polinucleótidos.

En una realización, las secuencias se modifican a partir del gen de patogenicidad de la plaga para crear o aumentar la homología del gen de patogenicidad de más de una plaga.

En otra realización, las secuencias se modifican a partir del gen de patogenicidad de la plaga para acortar un marco de lectura abierto.

En otra realización, las secuencias se modifican a partir del gen de patogenicidad de la plaga para producir menos homología con un gen de planta, animal o humano.

En otra realización, las secuencias homosentido y antisentido comprnden regiones duplicadas de un gen de patogenicidad de la plaga. La selección de tales regiones se realiza de acuerdo con las descripciones de la invención de la presente memoria (por ej., regiones altamente conservadas).

En otras realizaciones, las regiones de un gen de patogenicidad de la plaga o incluso la región codificadora completa de un gen de patogenicidad de la plaga puede estar duplicada para comprender las secuencias homosentido y antisentido que aumentan la longitud de la región de doble cadena formada por las secuencias homosentido y antisentido. Sin estar aferrado a la teoría, se considera que en algunas realizaciones de la presente invención, se debe formar un nivel umbral de los ARNsi para 'estimular el silenciamiento génico útil en la plaga y conferir resistencia a la plaga en la planta. La duplicación de las secuencias génicas es una manera útil de aumentar la longitud de la cadena doble y aumentar el número de ARNsi.

Este método (duplicación génica) está demostrado en los ejemplos de la presente memoria mediante el polinucleótido heterólogo pVZA300 (SEC ID 7) que comprende el INF1de elicitina de *Phytophthora infestans* (GenBank locus AY766228). Esta secuencia se selecciona debido a su alta homología para muchos otros genes de elicitina expresados por el género *Phytophthora*, lo cual sugiere que se podrían silenciar muchos otros genes de elicitina y de este modo proporcionar resistencia a muchas especies de *Phytophthora*. La secuencia seleccionada era de 282 de longitud, en consecuencia la secuencia se repitió (= 564 nt) en ambas orientaciones homosentido y antisentido para aproximar las longitudes de las porciones homosentido y antisentido de pVZA100 (SEC ID 5), pVZA200 (SEC ID 6) y pVZA400 (SEC ID 8) que han sido extraordinariamente exitosas.

El éxito de este método se demostró por el espectacular efecto del pVZA300 para reducir el crecimiento y causar la malformación de las hifas de *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora sojae* transformadas (Figura 14 D, F) en comparación con los efectos de las transformaciones con pCAMBIA1201, pVZA100 o pVZA200. Los plásmidos pVZA200 y pVZA300 son parcialmente idénticos con los que contienen el gen de catepsina, pero pVZA300 tambi´n contiene el gen de elicitina repetido. En consecuencia, el impacto perjudicial del pVZA300 sobre los hongos se puede deber al gen de elicitina. Esto tiene consecuencias muy positivas para el desarrollo de las plantas resistentes a *Phytophthora* y la aplicación de este método para eliminar la patogenicidad de suelos contaminados con *Phytophthora*.

**Métodos de transformación**

Una amplia variedad de métodos están disponibles para introducir los polinucleótidos heterólogos de la presente invención en un huésped blanco en las condiciones que permitan el mantenimiento y expresión estable del polinucleótido. La particular elección de una tecnología de transformación será determinada por su eficiencia para transformar ciertas especies de plantas además de la experiencia y preferencia de la persona que practica la invención con una metodología particular de elección. Será evidente para el profesional experto que la elección particular de un sistema de transformación para introducir ácido nucleico en las células de la planta no es esencial o una limitación de la invención ni es la elección de la técnica para la regeneración de la planta.

Su bien varios métodos de transformación se describen en la presente memoria como métodos separados, el profesional experto reconocerá fácilmente que determinados métodos se pueden usar en combinación para aumentar la eficiencia del proceso de transformación. Los ejemplos no limitantes de tales métodos incluyen al bombardeo con micropartículas recubiertas de Agrobacterium (EP-A-486234) o bombardeo con microproyectiles para inducir la lesión seguido por el cocultivo con Agrobacterium (EP-A-486233).

La administración directa se puede usar para transformar los hospedantes de planta de acuerdo con la presente invención. A modo de ejemplo no limitante, tales

métodos de administración directa incluyen al tratamiento con polietilen glicol, electroporación, captación de ADN mediado por liposomas (por ej. Freeman et al. Plant Cell Physiol. 29: 1353 (1984)), o el método de agitación con vórtex (por ej. Kindle, PNAS U.S.A. 87: 1228 (1990d). Una forma de administración directa de ADN es la transferencia del gen directa en los protoplastos de, por ejemplo, cultivos de una suspensión de células embriogénicas (Lazzeri and Lorz (1988) Advances in Cell Culture, Vol. 6, Academic press, p. 291; OziasAkins and Lorz (1984) Trends in Biotechnology 2: 1 19).

**Vía de polinización**

El profesional experto es consciente de ciertos desafíos de la transformación dependiente del genotipo que surgen del bajo potencial de regeneración de los cereales. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, la transformación se obtiene por un método de transformación independiente del genotipo basado en la vía de polinización (Ohta Y., 1986). En el maíz, la transformación genética de alta eficiencia se puede lograr por un mezcla de polen y ADN exógeno (Luo Z. X. and Wu R., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:715-719). El maíz se puede reproducir por técnicas de autopolinización y polinización cruzada. El maíz presenta flores masculinas y femeninas separadas en al misma planta, localizadas en la panoja y la espiga, respectivamente. La polinización natural se produce en el maíz cuando el viento sopla de las panojas a los filamentos que sobresalen de los extremos superiores de las espigas.

La transformación del arroz de acuerdo con la presente invención se puede obtener también por medio de la vía del tubo de polen (Plant Molecular Biology Reporter 6:165-174). Las ventajas potenciales importantes del método de la vía del tubo de polen incluyen: (a) independencia del genotipo (b) carencia del mosaicismo; (c) no requerimiento de técnicas complicadas de cultivos de células y tejidos.

La transformación del tomate y melón con los polinucleótidos heterólogos de acuerdo con la presente invención se pueden obtener en plantas intactas por medio de la vía de polinización (Chesnokov, Yu. V., et al, 1992, USSR Patente No. 1708849; Bulletin of the USSR Patents, No. 4; Chesnokov Yu. V. & Korol A. B. 1993; Genetika

201
209

USSR, 29:1345-1355). Los procedimientos de la transformación genética basada en la vía de fecundación-polinización incluye: (i) empleo de una mezcla (pasta) del polen y el ADN transformante; (ii) administración del ADN foráneo en el tubo del polen, después de la polinización y (iii) bombardeo de micropartículas de micosporas o granos de polen.

**Tecnología del Agrobacterium**

En una realización de la presente invención, las planta hospedantes se transforman mediante la tecnología del Agrobacterium. La transferencia mediada por Agrobacterium es un sistema aplicado ampliamente para introducir genes en las células de la planta ya que el ADN se puede introducir en todos los tejidos de la planta, de este modo se evita la necesidad de regeneración de una planta intacta a partir de un protoplasto. El uso de los vectores integrantes de planta mediados por el Agrobacterium para introducir el ADN en las células de planta es bien conocido en el arte. Ver, por ejemplo, los métodos descriptos por Fraley et al., (1985), Rogers et al., (1987) y Patente Estadounidense No. 5.563.055, incorporadas específicamente en su totalidad en la presente memoria como referencia.

La transformación mediada por el Agrobacterium se puede usar eficientemente con plantas hospedantes dicotiledóneas de la presente invención que incluyen, a modo de ejemplo no limitante, *Arabidopsis*, maíz, soja, algodón, canola, tabaco, tomate y papa.

La transformación mediada por el Agrobacterium también es aplicable a casi todas las plantas monocotiledóneas de la presente invención. A modo de ejemplo no limitante, tales tecnologías de plantas monocotiledóneas son adaptable a arroz (Hiei et al., 1997; Zhang et al., 1997; (Ishida et al., 1996); Patente Estadounidense No. 5.591.616, incorporada específicamente en su totalidad en la presente memoria como referencia), trigo (McCormac et al., 1998), y cebada (Tingay et al., 1997; McCormac et al., 1998).

La transformación mediada por el Agrobacterium, de acuerdo con la presente invención, se pude obtener con protoplastos aislados cultivados y por la transformación de las células o tejidos intactos.

La transformación mediada por el Agrobacterium en dicotiledóneas facilita la administración de porciones mayores de ácidos nucleicos heterólogos en comparación con otros métodos de transformación tales como bombardeo de partículas, electroporación, métodos de transformación mediado por polietilenglicol y similares. Además, la transformación mediada por el Agrobacterium parece producir relativamente pocos reordenamientos génicos y más típicamente produce la integración de bajo número de copias génicas en el cromosoma de planta.

Los vectores modernos de transformación con Agrobacterium son capaces de la replicación en *E. coli* además del Agrobacterium, lo cual permite manipulaciones convenientes como las descriptas (Klee et al., 1985). Además, los recientes avances tecnológicos en los vectores para transferencia génica mediada por Agrobacterium han mejorado el ordenamiento de los genes y sitios de restricción de los vectores para facilitar la construcción de vectores capaces de expresar diversos genes codificadores de polipéptidos. Los vectores descriptos (Rogers et al., 1987) presentan regiones multi-ligadoras flanqueadas por un promotor y un sitio de poliadenilación para la expresión directa de genes codificadores de polipéptidos insertados y son adecuados para la los presentes propósitos. Además, el Agrobacterium que contiene tanto los genes Ti armados como los desarmados se pueden usar para las transformaciones. En estas cepas de plantas en las que la transformación mediada por Agrobacterium es eficiente, este es el método de elección debido a la naturaleza fácil y definida de la transferencia génica.

Cuando el *Agrobacterium (por ej. A. tumefaciens* y *A. rhizogenes)* se usa para transformar células de plantas de acuerdo con la presente invención, el ADN que va a insertar se puede clonar en plasmados especiales, a saber en un vector intermediario o en un vector binario. Los vectores intermediarios se pueden integrar en el plásmido Ti o Ri por recombinación homóloga debida alas secuencias que son homólogas a las secuencias del ADN-T. El plásmido Ti o Ri también comprende la región vir necesaria para la transferencia del ADN-T. Los vectores intermediarios no pueden replicarse a sí mismos en las *Agrobacteria*. El vector intermediario se puede transferir en *Agrobacterium tumefaciens* por medio de un plásmido auxiliar (conjugación).

Los vectores binarios se pueden replicarse a sí mismos en *E. coli* y en las *Agrobacteria*. Tales vectores pueden comprender un gen del marcador de selección y un ligador o poliligador que está enmarcados por las regiones límites derecha e izquierda del ADN-T. Estos se pueden transformar directamente en las *Agrobacteria* (Holsters *et al.* [1978] *Mol. Gen. Genet.* 163:181-187). El *Agrobacterium* usado como célula huésped es para comprender un plásmido que porta una región vir. La región vir es necesario para la transferencia del ADN-T en la célula de la planta. Puede contener ADN-T adicional. La bacteria así transformada se usa para la transformación de las células de plantas. Los explantes de plantas se pueden cultivar ventajosamente con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para la transferencia del ADN en una célula de la planta. Las plantas completas luego se pueden regenerar a partir del material de planta infectado (por ejemplo, porciones de hoja, segmentos de tallo, raíces, pero también protoplastos o células cultivadas en una suspensión) en un medio adecuado que puede contener antibióticos o biocidas para la selección. Las plantas obtenidas de esta manera luego se pueden examinar por la presencia de los polinucleótidos heterólogos insertados. No se realizan demandas especiales de los plásmidos en el caso de la inyección y electroporación. Es posible usar plásmidos ordinarios, tales como, por ejemplo, derivados de pUC.

Otra tecnología de transformación incluye la tecnología de filamentos. Ver Patente Estadounidense Nos. 5.302.523 y 5.464.765, ambas de Zeneca.

**Bombardeo de microproyectiles**

Opcionalmente, las células de la planta hospedante se transforman de acuerdo con la invención por bombardeo de microproyectiles (Patente Estadounidense No. 5.550.318; Patente Estadounidense No. 5.538.880; Patente Estadounidense No. 5.610.042; y Patente Estadounidense No. 5.590.390; cada una de las cuales está incorporada en su totalidad específicamente en la presente memoria como referencia). En esta realización, las partículas están recubiertas con ácidos nucleicos y se administran en las células por una fuerza propulsora. Los ejemplos de partículas incluyen a las que comprenden tungsteno, platino y con preferencia, oro. Está contemplado que en algunos casos la precipitación del ADN en las partículas metálicas

204
204

no será necesaria para la administración del ADN a una célula recipiente mediante el bombardeo de microproyectiles. Sin embargo, está contemplado que las partículas pueden contener ADN más que estar recubiertas con ADN. En consecuencia, se propone que las partículas recubiertas con ADN pueden aumentar el nivel de administración de ADN por bombardeo de partículas pero no son en sí mismas necesarias.

Para el bombardeo, las células en suspensión se concentran en filtros o medios de cultivo sólidos. Alternativamente, los embriones inmaduros u otras células blanco se disponen en un medio de cultivo sólido. Las células bombardeadas se ubican en una distancia apropiada por debajo de la palca de detención de microproyectiles.

Una realización ilustrativa del método de transformación para administrar los vectores del sujeto en las células de las plantas por aceleración es el sistema de administración de partículas biolísticas (BioRad, Hercules, Calif.), el cual se usa para propulsar partículas recubiertas con ADN o células a través de un tamiz, tal como un tamiz de acero inoxidable o Nytex, en una superficie del filtro cubierta con células de planta cultivadas en suspensión. El tamiz dispersa las partículas de modo que estas se liberan alas células recipientes en agregados mayores. Si bien no está vinculado por la teoría, se considera que un tamiz que interviene entre el aparato proyectil y las células bombardeadas reduce el tamaño del agregado de los proyectiles y puede contribuir a una mayor frecuencia de transformación al reducir el daño infligido en las células recipientes por proyectiles que son demasiado grandes.

Para el bombardeo, las células en suspensión con preferencia se concentran en filtros o medio de cultivo sólidos. Alternativamente, los embriones inmaduros u otras células blanco se disponen en un medio de cultivo sólido. Las células bombardeadas se ubican en una distancia apropiada por debajo de la palca de detención de microproyectiles. Si se desea, se pueden colocar uno o más tamices entre el dispositivo de aceleración y las células que se van a bombardear. Mediante el uso de las técnicas expuestas en la presente memoria se puede obtener hasta 1000 o más focos de células que expresan transitoriamente un gen marcadora. El número de células de un foco que expresan el producto del gen exógeno 48 horas pos-bombardeo con frecuencia varía de 1 a 10 y promedio 1a 3.

Un experto en el arte puede optimizar las condiciones de cultivo pre-bombardeo y los parámetros del bombardeo producen las cantidades máximas de transformantes estables. Los parámetros físicos y biológicos para el bombardeo son importantes en esta tecnología. Los factores físicos son los que incluyen la manipulación del ADN/precipitado de microproyectiles o los que afectan el vuelo y velocidad de los micorproyectiles. Los factores biológicos incluyen a todos los pasos involucrados en la manipulación de células antes e inmediatamente después del bombardeo, el ajuste osmótico de las células blanco para ayudar a aliviar el trauma asociado con el bombardeo, y también la naturaleza del ADN transformante, tal como ADN linealizado o plásmidos superenrollados intactos. Se considera que las manipulaciones pre-bombardeo son especialmente importantes para la transformación exitosa de los embriones inmaduros.

Por consiguiente, está contemplado que el profesional experto puede ajustar los parámetros del bombardeo en estudios de baja escala para optimizar completamente las condiciones. Se puede desear particularmente ajusta los parámetros físicos tales como distancia de apertura, distancia de vuelo, distancia del tejido y presión de helio. También se pueden minimizar los factores de reducción del trauma (TRF) por la modificación de las condiciones que influyen en el estado fisiológico de las células recipientes y que pueden en consecuencia influir en las eficiencias de transformación e integración. Por ejemplo, el estado osmótico, hidratación del tejido y el estadio de subcultivo o ciclo celular de las células recipientes se puede ajustar para la transformación óptima. Los resultados de tales estudios de optimización en pequeña escala se describen en la presente memoria y la ejecución otros ajustes de rutina serán conocidos para los expertos en el arte a la luz de la presente descripción.

La transformación por bombardeo de microproyectiles es ampliamente aplicable y se puede usar para transformar virtualmente cualquiera de las especies de plantas. Las monocotiledóneas opcionalmente se transforman por bombardeo de acuerdo con la presente invención, por ejemplo maíz (Patente Estadounidense No. 5.590.390), cebada (Ritala et al., 1994; Hensgens et al., 1993), trigo (Patente Estadounidense No. 5.63.55, incorporada específicamente en su totalidad en la presente memoria como referencia), arroz (Hensgens et al., 1993), avena (Torbet et al., 1995; Torbet et al., 1998), centeno

(Hensgens et al., 1993), caña de azúcar (Bower et al., 1992) y sorgo (Casa et al., 1993; Hagio et al., 1991);

Las dicotiledóneas opcionalmente se transforman por bombardeo de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, tabaco (Tomes et al., 1990; Buising and Benbow, 1994), soja (Patente Estadounidense No. 5.322.783,incorporada específicamente en su totalidad en la presente memoria como referencia), girasol (Knittel et al. 1994), maní (Singsit et al., 1997), algodón (McCabe and Martinell, 1993), tomate (Van Eck et al. 1995) y legumbres en general (Patente Estadounidense No. 5.563.055, incorporada específicamente en su totalidad en la presente memoria como referencia).

**Electroporación**

En una realización, las células de planta se transforman mediante el método de electroporación, Ver, *por ejemplo,* WO 87/06614 del Boyce Thompson Institute; Patentes Estadounidenses Nos. 5.472.869 y 5.384.253, ambos de Dekalb y WO 92/09696 y WO 93/21335, ambos en Plant Genetic Systems.

El método de Krzyzek et al. (Patente Estadounidense No. 5.384.253, incorporada específicamente en su totalidad en la presente memoria como referencia), es bien adecuada para la presente invención. En este método, determinadas enzimas de degradación de la pared celular, tales como enzimas de degradación de pectina, se emplean para producir las células recipientes blanco más susceptibles a la transformación por electroporación que las células no tratadas. Alternativamente, producir las células recipientes se vuelven más susceptibles a la transformación por lesión mecánica.

El método de Tada, Y., et al (Efficient gene introduction to rice by electroporation and analysis of transgénica plants: Use of electroporation buffer lacking chloride ions, Theor Appl Genet, Vol. 80: 475-480, 1990) es, por ejemplo, adecuada para la transformación del arroz.

En una realización, para efectuar la transformación por electroporación, se usan tejidos friables, tales como un cultivo en suspensión de células o callos embriogénicos.

Opcionalmente, los embriones inmaduros u otros tejidos organizados se transforman en forma directa. En esta técnica, las paredes celulares se degradan parcialmente por la exposición a enzimas de degradación de pectinas (pectoliasa) o lesión en forma mecánica de manera controlada .

Los ejemplos no limitantes de células hospedantes de plantas que se pueden transformar por electroporación de las células intactas de acuerdo con la presente invención son trigo (de acuerdo con, por ejemplo, Zhou et al., 1993), tomate (de acuerdo con, por ejemplo Hou and Lin, 1996), soja (de acuerdo con, por ejemplo Christou et al., 1987) y tabaco (Lee et al., 1989). Ver también la Patente Estadounidense No. 5.384.253; Rhodes et al., 1995; y D'Halluin et al., 1992

En una realización, las plantas se transforman por la electroporación de protoplastos (de acuerdo con, por ejemplo, Bates, 1994; Lazzeri, 1995). Los ejemplos no limitantes de células hospedantes de plantas que se pueden transformar por electroporación de las células de protoplastos de acuerdo con la presente invención son plantas de soja (de acuerdo con, por ejemplo, Dhir y Widholm en la publicación PCT Publication No. WO 92/17598, incorporada específicamente en la presente memoria como referencia), cebada (por ej., Lazerri, 1995), sorgo (por ej., Battraw et al., 1991), (por ej., Bhattacharjee et al., 1997), trigo (por ej., He et al., 1994) y tomate (por ej. Tsukada, 1989).

**Vectores virales**

Además, los vectores virales también se pueden usar para transformar plantas de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, las plantas monocotiledóneas se pueden transformar por un vector viral mediante los métodos descriptos en las Patentes Estadounidenses Nos. 5.569.597 para Mycogen Plant Science y Ciba-Giegy, actualmente Novartis.

La Patente Estadounidense No. 5.589.367 también describe la transformación de la planta con un vector viral.

La Patente Estadounidense No 5.316.931 describe la transformación de la planta con un vector viral.

Un gran número de vectores de clonación útiles para las plantas superiores (que incluyen monocotiledoneas y dicotiledóneas) de acuerdo con la presente invención comprende un sistema de replicación del *E. coli* y un marcador que permite la selección de las células transformadas. Estos vectores comprenden por ejemplo, pBR322, serie pUC, serie M13mp, pACYC184, etc., y pCAMBIA 1201. Por consiguiente, la secuencia que comprende un polinucleótido heterólogo de la presente invención se puede insertar en el vector con un sitio de restricción adecuada. El plásmido resultante se usa para la transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutriente adecuado, luego se recolectan y se lisan. El plásmido se recupera. Los métodos de análisis de secuencia, análisis de restricción, electroforesis y otros métodos biológicos moleculares-bioquímicos generalmente se llevan a cabo como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN usada puede escindir y unir al secuencia de ADN próxima. Cada secuencia de plásmido se puede clonar en el mismos u otros plásmidos. De acuerdo con el método de inserción de los genes deseados en al planta, pueden ser necesarias otras secuencias de ADN. Si, por ejemplo, se usa el plásmido Ti o Ri para la transformación de la célula de la planta, entonces por lo menos el límite derecho, pero con frecuencia el límite derecho ye izquierdo del ADN-T del plásmido Ti o Ri se unen como la región flanqueante ed lo genes que se van a insertar (**Figura 1**).

El uso de ADN-T para la transformación de células de planta se describer en EP 120 516; Hoekema (1985) In: *The Binary Plant Vector System*, Offset-durkkerij Kanters B.V., Alblasserdam, Chapter 5; Fraley *et al.*, *Crit. Rev. Plant Sci.* 4:1-46; An *et al.* (1985) *EMBO J.* 4:277-287; y muchas referencias posteriores ampliamente conocidas y disponibles por los expertos en el arte.

**Genes marcadores**

Con el fin de mejorar la capacidad de identificar los transformantes, se puede desear emplear uno o más genes marcadores de un polinucleótido heterólogo de la presente invención.

Los genes marcadores, de acuerdo con la presente invención, incluyen a los que codifican un marcador seleccionable y los que codifican un marcador detectable, el cual

depende si el marcador confiere un rasgo que se puede "seleccionar" por medios químicos, es decir, mediante el uso de un agente selectivo (por ej., un herbicida, antibiótico o similares), o si es simplemente un rasgo "indicador" que se puede identificar por la observación o examen, es decir, por la "detección". Por supuesto se conocen muchos ejemplos de genes marcadores o genes indicadores adecuados en el arte y se pueden emplear en al práctica de la invención.

Dentro de los términos genes marcadores seleccionables o detectables también se incluyen a los genes que codifican a un "marcador secretable" cuya secreción se puede detectar como un medio de identificación o selección de las células transformadas. Los ejemplos incluyen a los marcadores que codifican un antígeno secretable que se puede identificar por interacción con anticuerpos, o aun enzimas secretables que se pueden detectar por sus actividad catalítica. Las proteínas secretables se incluyen en varias clases, que incluyen a pequeñas proteínas difusibles detectables, por ej., por ELISA, y proteínas que están insertadas o atrapadas en la pared celular (por ej., proteínas que incluyen una secuencia líder tal como la que se halla en la unidad de expresión de la extensina o tabaco PR-S).

Con respecto a los marcadores secretables seleccionables, el uso de un gen que codifica una proteína que será secuestrada en la pared celular y se considera que la proteína que incluye un epítope único es particularmente ventajosa. Tal marcador antigénico secretado, idealmente podría emplear una secuencia del epitope que proporcionaría un umbral bajo para el tejido de planta, una secuencia líder del promotor que podría impartir una expresión y localización eficiente a través de la membrana plasmática y produciría una proteína que está unida en la pared celular y aún accesible para los anticuerpos. Una proteína de la pared secretada normalmente modificada para incluir un epitope único podría satisfacer todos estos requisitos.

Un ejemplo de una proteína adecuada para la modificación de esta manera es la extensina o una glicoproteína rica en hidroxiprolina (HPRG). El usos de la e HPRG (Stiefel et al., 1990) está bien caracterizado en términos de biología molecular, expresión y estructura de la proteína. Sin embargo, alguna de una variedad de extensinas y/o proteínas de la pared ricas en glicinas (Keller et al., 1989) se podría modificar por la adición de un sitio antigénico para crear un marcador detectable.

Los elementos de la presente descripción se ejemplifican con detalle mediante el uso de genes marcadores particulares. Sin embargo, a la luz de esta descripción, numerosos genes marcadores seleccionables y/o detectables diferentes serán evidentes para los expertos en el arte además de los que se exponen a continuación en la presente memoria. En consecuencia, se considerará que la siguiente descripción es un ejemplo más que exhaustivo.

**Marcadores seleccionables**

Los marcadores seleccionables para uso en conexión con la presente invención incluye, pero sin limitación a, un gen *neo* (Potrykus et al., 1985) que codifica para la resistencia a kanamicina y se ende seleccionar por medio de kanamicina, G418, y similares; un gen *bar* que codifica para la resistencia a bialafós; un que codifica una proteína EPSP sintasas alterada (Hinchee et al., 1988) de este modo confiere resistencia al glifosato; un gen de nitrilasa tal como *bxn* de *Klebsiella ozaenae* que confiere resistencia a bromoxinilo (Stalker et al., 1988); un gen de acetolactato sintasa mutante (ALS) o gen de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) que confiere resistencia a imidazolinona, sulfonilurea u otros productos químicos que inhiben a ALS (Solicitud de Patente Europea 154.204);un gen de DHFR resistente a metotrexate (Thillet et al., 1988); un gen de dalapon deshalogenasa que confiere resistencia al herbicida dalapon (Patente Estadounidense No. 5.780.708); o un gen de antranilato sintasa mutado que confiere resistencia a 5-metil triptofano (Publicación PCT No. WO 97/26366). Cuando se emplea un gen de EPSP sintasa mutante, se puede obtener un beneficio adicional mediante la incorporación de un péptido de tránsito de cloroplasto adecuado, CTP (Patente Estadounidense No. 4.940.835). Ver también, Lundquist et al., Patente Estadounidense No. 5.508.468.

Una realización ilustrativa de un gen marcador seleccionable capaz de usarse en realizaciones de la presente invención para seleccionar transformantes son los que codifican la enzima fosfinotricin acetiltransferasa, tal como el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* o el gen *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* (Patente Estadounidense No. 5.550.318, que está incorporada en la presente memoria como referencia). La enzima fosfinotricin acetiltransferasa (PAT) inactiva el elemento activo

del herbicida bialafos, fosfinotricin (PPT). El PPT inhibe la l glutamina sintetasa, (Murakami et al., 1986; Twell et al., 1989) lo cual causa la acumulación rápida de amoníaco y la muerte celular.

Los genes del marcador seleccionable adecuados contemplados en la presente memoria incluyen a un gen de aminoglicósido fosfotranferasa, gen de neomicina fosfotranferasa, gen de resistencia a G418, gen de resistencia a glifosato, gen de resistencia a higromicina, gen de resistencia a metotrexate, gen de resistencia a imidazolinonas, gen de resistencia a sulfonilureas,gen de resistencia a herbicida de triazolopirimidina, gen de resistencia a ampicilina, gen de resistencia a tetraciclina, gen de resistencia a kanamicina bacteriana,gen de resistencia a fosfinotricina, gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y gen de luciferasa, entre otros.

**Marcadores detectables**

Los marcadores detectables que se pueden emplear incluyen, pero sin limitación a, gen de beta-glucuronidasa o *uidA* (GUS) que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos, un gen del locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos de plantas (Dellaporta et al., 1988); un gen de beta-lactamasa (Sutcliffe, 1978), que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (por ej., PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen xyle (Zukowsky et al., 1983), que codifica una catechol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos; un gen de alfa-amilasa (Ikuta et al., 1990); un gen de tirosinasa (Katz et al., 1983), que codifica una enzima capaz de oxidar tirosina a DOPA y doapquinona que a su vez se condensa para formar el compuesto fácilmente detectable melanina; un gen de beta-galactosidasa, que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos; un gen de luciferasa (lux) (Ow et al., 1986), que permite la detección de bioluminescencia o incluso un gen de aecuorina (Prasher et al., 1985), que se puede emplear en la detección de bioluminiscencia sensible al calcio o un de la proteína verde fluorescente(Niedz et al., 1995).

Los genes del complejo génico R están contemplados como marcadores detectables útiles. El complejo génico R codifica una proteína que actúa para regular la

producción de pigmentos de antocianina en la mayoría de las semillas y tejidos de planta. Las líneas de maíz pueden tener una o como mucho cuatro, alelos R que se combinan para regular la pigmentación en forma específica del desarrollo y tejido. De este modo, un gen R introducido en tales células causará la expresión de un pigmento rojo y si se incorpora en forma estable, se puede clasificar visualmente como un sector rojo. Si una línea porta los alelos dominantes para genes que codifican los intermediarios enzimáticos de la vía biosintética de la antocianina (C2, A1, A2, Bz1 y Bz2), pero porta un alelo recesivo en el locus R, la transformación de cualquier célula de esta línea con R causará la formación del pigmento rojo. Los ejemplos de líneas incluyen a Wisconsin 22 que contiene el alelo rg-Stadler y TR112, un derivado de K55que es r-g, b, P1. Alternativamente, se puede usar cualquier genotipo del maíz si los alelos C1 y R se introducen juntos.

Además está contemplado que las regiones regulatorias del gen R se pueden emplear en los polinucleótidos heterólogos de la presente invención con el fin de proporcionar mecanismos para controlar la expresión de tales polinucleótidos heterólogos. Se sabe que existe más diversidad de expresión fenotípica en el locus de R que en cualquier otro locus (Coe et al., 1988). Está contemplado que las regiones regulatorias obtenidas de las regiones 5' del gen estructural R deberían ser valiosas para dirigir la expresión de los genes, por ej., resistencia a los insectos, resistencia a la sequía, tolerancia a herbicidas u otras regiones codificadoras de la proteína. Para los propósitos de la presente invención, se considera que alguna de los diversos miembros de la familia del gen R se puede emplear con éxito (por ej., P, S, Lc, etc.). Sin embargo, el más preferido generalmente será Sn (particularmente Sn:bol3). Sn es un miembro dominante del complejo del gen R y es funcionalmente similar a los locus de R y B en que Sn controla el depósito especifico de tejido de los pigmentos de antocianina en ciertas células de plántula y planta, en consecuencia, su fenotipo es similar a R.

Un marcador detectable adicional contemplado para usar en la presente invención es la luciferasa de luciérnaga, codificado por el gen *lux*. La presencia del gen *lux* en las células transformadas se puede detectar mediante, por ejemplo, película de rayos X, contador de centelleo, espectrometría fluorescente, cámaras de video cámaras de luz baja, cámaras de recuento de fotones o luminometría multipocillo. También se

prevé que este sistema se puede desarrollar para la detección de poblaciones por bioluminiscencia, tal como en placas de cultivo deejido o incluso detección de la planta completa.

**Distribución en cadenas del gen marcador**

De acuerdo con la presente invención, los genes marcadores se pueden diseñar por la selección de secuencia y posición dentro del heteropolinucleótido para originar un marcador positivo o negativo. Cuando un heteropolinucleótido contiene secuencias de un gen marcador pero no contiene suficientes secuencias complementarias con el gen del marcador, un transcripto del heteropolinucleótido contendrá el gen del marcador en una región de cadena simple y se puede expresar. De este modo, la expresión se correlaciona con la integración del heteropolinucleótido en la planta hospedante. Cuando un heteropolinucleótido contiene suficientes secuencias complementarias con el gen del marcador, un transcripto del heteropolinucleótido contendrá el gen del marcador en una región de doble hebra y será silenciado. De este modo, la expresión de tal gen marcador indicará que el heteropolinucleótido no sea silenciado en la planta hospedante (es decir, "marcador negativo"). Cuando una célula de planta se transforma con un heteropolinucleótido que comprende tanto un gen del marcador positivo como uno del marcador negativo expresa el gen del marcador positivo pero no expresa el gen del marcador negativo, esto indica que la planta transcribe y silencia por lo menos parte del heteropolinucleótido. De este modo la expresión se correlaciona con la integración del heteropolinucleótido en la planta hospedante (es decir, se pueden seleccionar secuencias positivas).

**Elección de la secuencia del gen marcador.**

En la actualidad un profesional experto reconocerá fácilmente como se pueden efectuar combinaciones de marcadores en diferentes posiciones de un polinucleótido heterólogo de la presente invención. Tales diferencias de posición se efectúan este o no silenciado el marcador (por ej., un gen dentro de la región que forma una estructura de doble hebra por medio de enlaces hidrógeno es reconocido como extraño por los

mecanismos de defensa interna de la planta y se hidrolizan en un ARNsi [es decir, "silenciado"]).

Por ejemplo, en una realización, un polinucleótido heterólogo de la presente invención contiene el hipotético gen A (o sea, cualquier gen marcador de la presente invención) corriente arriba de la región de doble hebra y un hipotético gen B dentro de la región de doble hebra. Una célula no transformada deficiente en la expresión de A ("A-"). También está B- y C-. Una célula transformada que inactiva funcionalmente a la región B (por ej., por silenciamiento génico de la región donde reside el gen B) es A+ y B-. Una célula transformada que falla en inactivar la región B es A+ y B+.

Un experto profesional ahora reconocerá que la presencia de las secuencias antisentido del gen marcador, apropiadamente colocado corriente debajo de las secuencias homosentido del marcador génico, facilitará además el e silenciamiento génico (por ej., formación de doble hebra) de tal gen marcador.

También se deberá reconocer fácilmente que un marcador localizado corriente abajo de una región de doble hebra también se silenciará si ningún promotor reside entre tal región de doble cadena y tal marcador.

En una realización, los polinucleótidos heterólogos de la presente invención incluye a los que tiene la estructura expuesta en la Tabla 7.

215
~~215~~

## Tabla 7 Polinucleótidos heterólogos

Tabla 7-A Polinucleótidos heterólogos

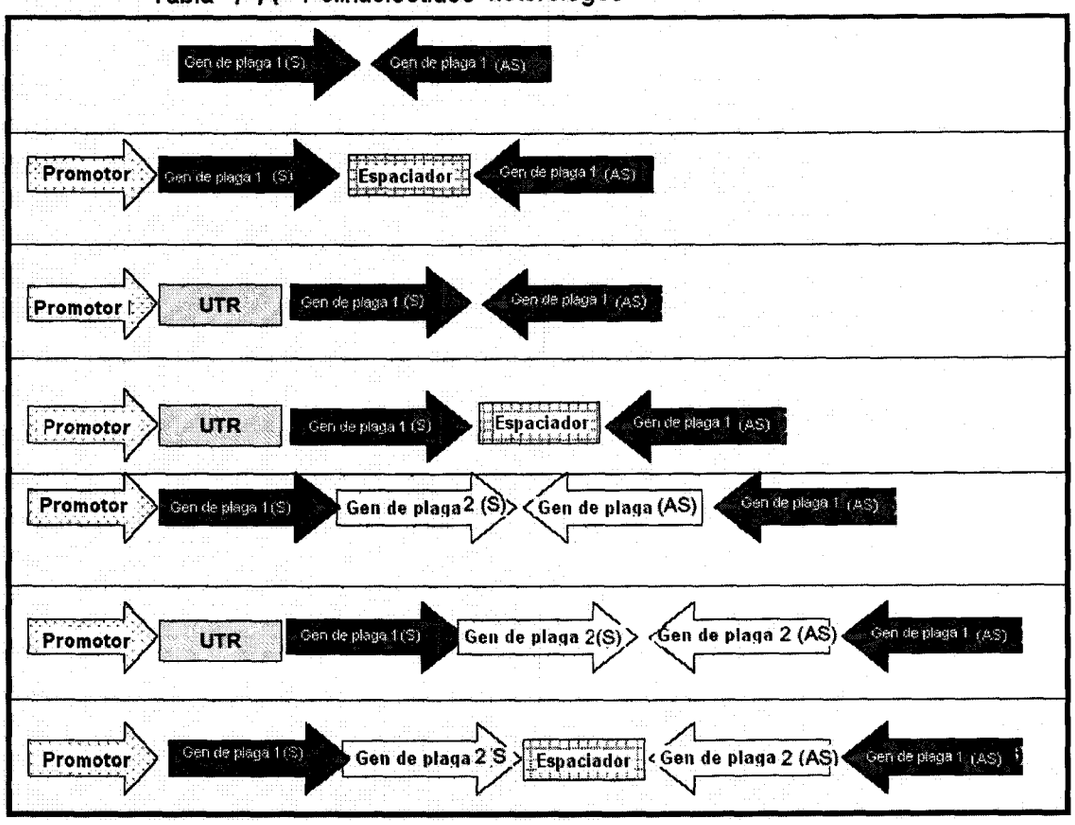


Tabla 7-B Polinucléotidos heterólogos

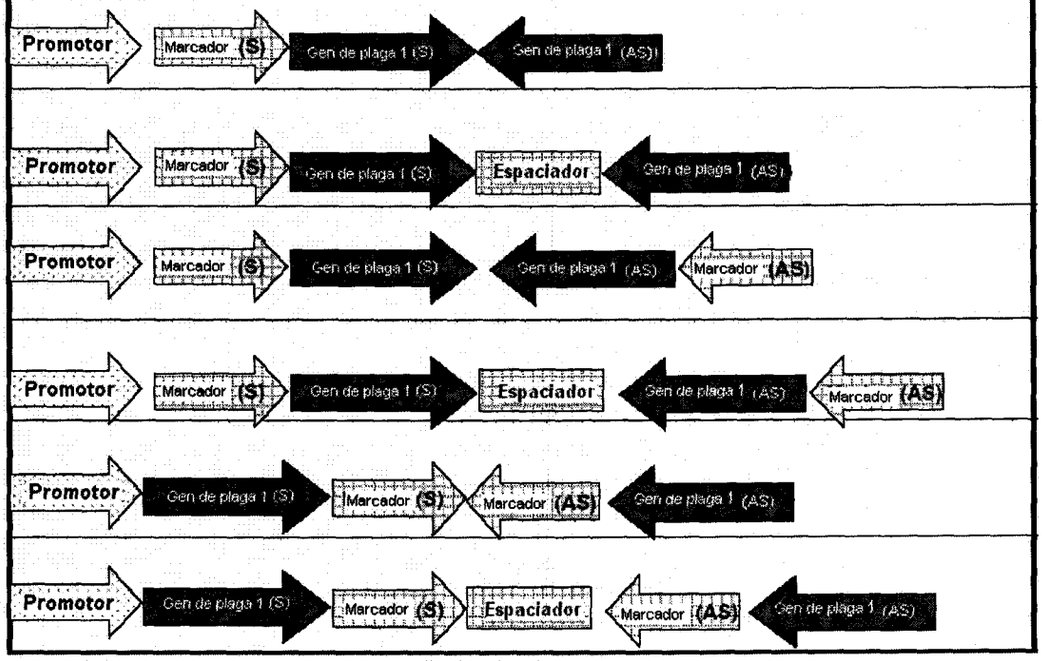
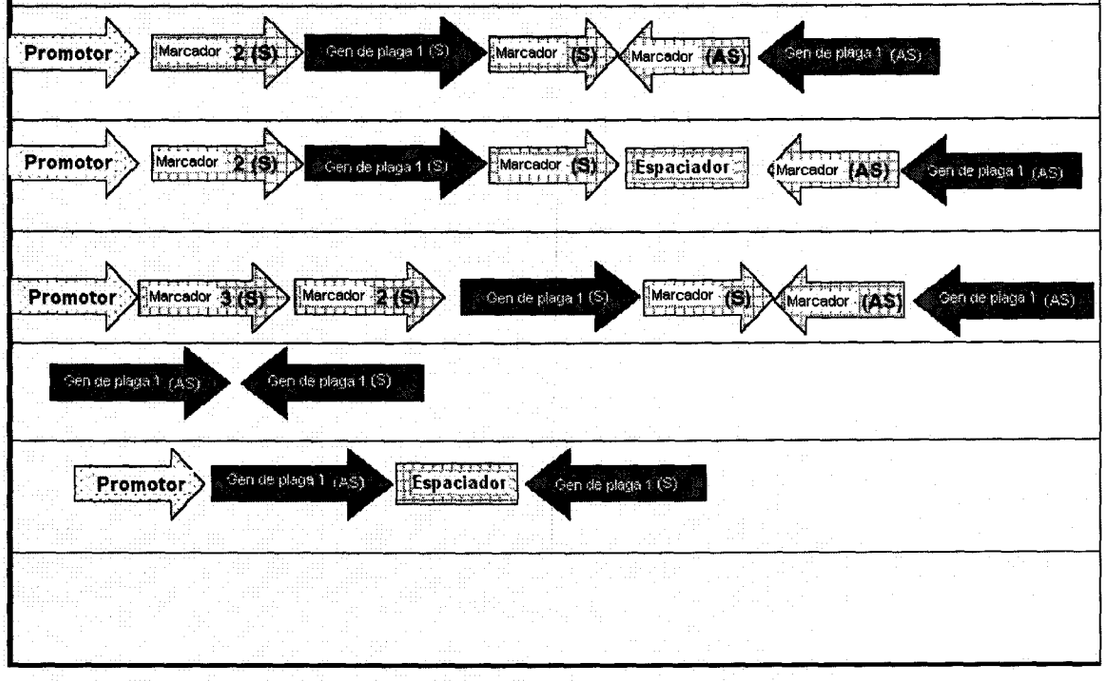
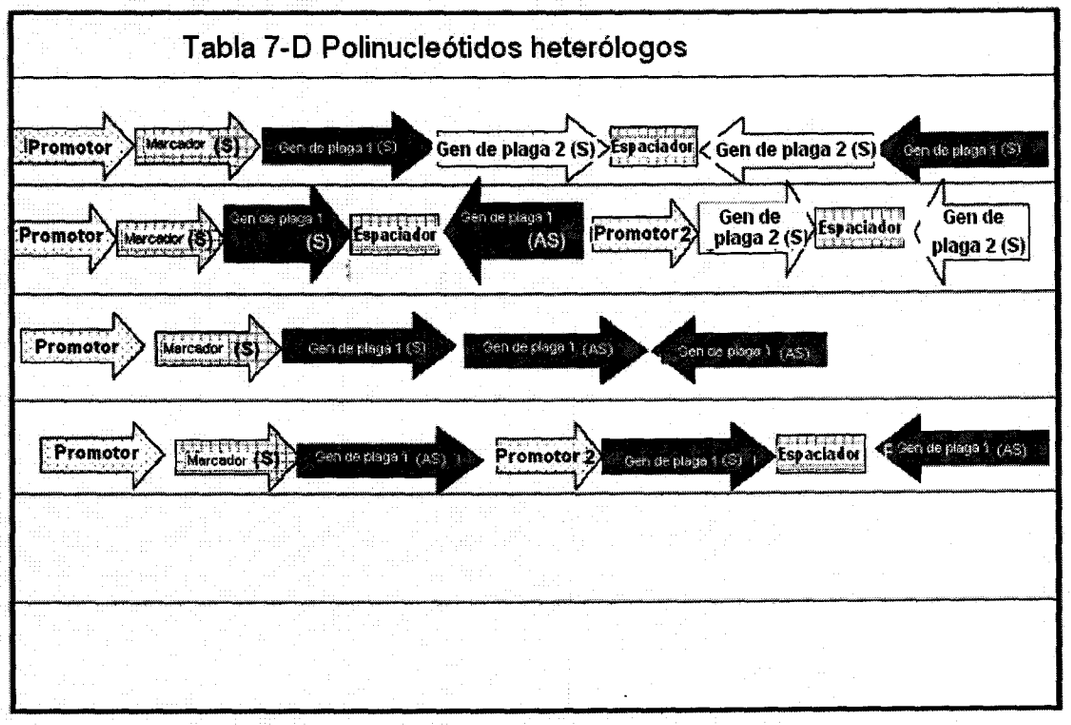
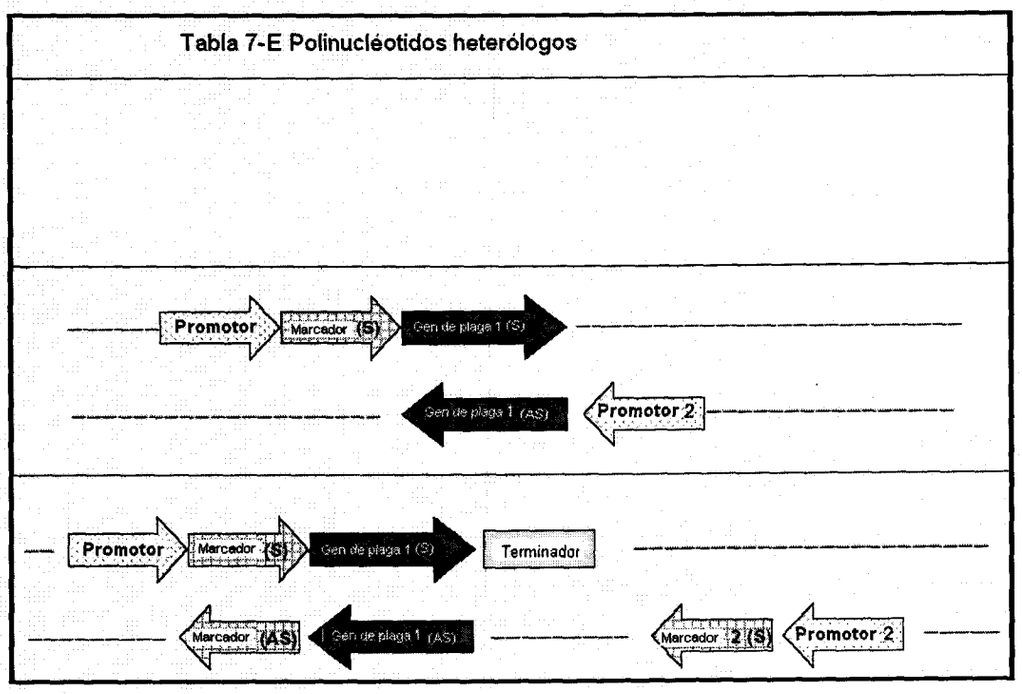



Tabla 7-C Polinucleótidos heterólogos






## 5 Promotor y elementos regulatorios

De acuerdo con la presente invención, un polinucleótido heterólogo o una porción del mismo, es capaz de transcribirse en una planta. En plantas, tal transcripción requiere un promotor que está operativamente unido al polinucleótido heterólogo. Tal

promotor puede ser endógeno a la planta. A modo de ejemplo, un polinucleótido heterólogo se puede insertar en forma adyacente a un promotor de planta constitutivo o inducible.

El polipéptidos heterólogo de la presente invención puede contener opcionalmente un promotor. Tal promotor puede ser un promotor de planta o un promotor de de planta que actúa en una planta.

Los promotores de planta incluyen pero sin limitación a una subunidad pequeña de ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP) carboxilasa (ssu), promotor beta-conglicinina, promotor beta-faseolina, promotor ADH, promotores de choque térmico y promotores específicos de tejido tal como un promotor constitutivo donde es deseable dirigir la expresión continua del gen en todos los tipos celulares y en todos tiempos (*por ej.*, actina, ubiquitina, CaMV 35S, y similares).

Los promotores de una variedad de fuentes se pueden usar en forma eficiente en células de planta que expresan los genes extraños. Por ejemplo,se pueden usar los elementos regulatorios promotores de origen bacteriano, tal como el promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de mannopina sintasa; promotores de origen viral, tal como el virus el mosaico del coliflor (35S y 19S), 35T (el cual es un promotor 35S rediseñado, ver Patente Estadounidense No. 6.166.302, especialmente en el Ejemplo 7E) y similares.

Puede ser deseable usar un promotor inducible, que es responsable para la expresión de genes en respuesta a una señal específica, tal como: estímulo físico (genes de choque térmico), luz (RUBP carboxilasa), hormona (Em), metabolitos, productos químicos y estrés. Se pueden usar otros elementos de transcripción y traducción deseables que actúan en plantas. Numerosos vectores de transferencia de genes específicos de planta son conocidos en el arte.

Puede ser deseable usar un promotor que está activo durante un cierto estadio del desarrollo de la planta además de activo en los tejidos y órganos de la plantas. Los ejemplos de tales promotores incluyen pero sin limitación a promotores específicos de polen, específicos del embrión, específicos de los estigmas del maíz, específicos de la fibra de algodón, específicos de raíz, específicos del endosperma de semilla y similares. Los elementos regulatorios del promotor especifico de tejido se pueden usar cuando

sea deseable promover la transcripción en tejidos tales como hojas o semillas (*por ej.*, zein, oleosina, napina, ACP, globulina y similares).

Si bien cualquier promotor que actúa en una célula de planta (es decir, mantiene la transcripción de un polinucleótido heterólogo) es útil en la presente invención, puede ser deseable seleccionar un promotor relativamente más fuerte o más débil. Una realización de la presente invención emplea un promotor fuerte para dirigir la secuencia homosentido de un gen de patogenicidad de la plaga y un promotor más débil para dirigir la secuencia antisentido del gen de patogenicidad de la plaga. Un experto en el arte puede determinar fácilmente la fuerza empírica del promotor en las realizaciones de la presente invención. Cuando una realización contiene dos promotores (que dirigen dos transcriptos diferntes), la tasa relativa de transcripción se puede determinar por la cuantificación de los transcriptos (por ej., PCR cuantitativa).

Los ejemplos de promotores que son relativamente fuertes son el promotor del virus del mosaico de la escrofularia y el promotor 35S CaMV mejorado. Un ejemplo de promotor que es relativamente débil es el promotor CaMV 35S. Un experto en el arte apreciará fácilmente que los promotores "más débil" y "más fuerte" es un termino relativo y estos se pueden identificar en forma empírica, por ejemplo, por PCR cuantitativa con los cebadores apropiados contra el transcripto que es dirigido por los promotores.

Otros elementos tales como regiones de unión de la matriz, regiones de unión al armazón proteico, intrones, potenciadores, secuencias de poliadenilación y similares pueden estar presentes y de este modo mejorar la eficiencia de transcripción o integración del ADN. Tales elementos pueden o no ser necesarios para la función del ADN, aunque ellos pueden proporcionar mejor expresión o funcionamiento del ADN. Tales elementos se pueden incluir en el ADN como se desee para obtener el desempeño óptimo del ADN transformado en la planta. Los elementos típicos incluyen pero sin limitación al intrón Adh 1, intrón Adh 6, la secuencia líder de la proteína de cubierta del virus del mosaico de la alfalfa,secuencia líder de la proteína de cubierta del virus de la raya del maíz, además de otros disponibles para el profesional experto.

220
226

**Terminador**

Los polinucleótidos heterólogos de la presente invención opcionalmente pueden contener un terminador. El término "terminador" se refiere a una secuencia de ADN del extremo de una unidad transcripcional que señala la terminación de la transcripción. Los terminadores eucariotas son secuencias de ADN no traducidas 3' que contienen una señal de poliadenilación, que facilita la adición de secuencias poli (A) del extremo 3' de un transcripto primario.

Los terminadores activos en las células derivadas de virus, levaduras, hongos, bacterias, insectos, pájaros, mamíferos y plantas son conocidos y están descriptos en la bibliografía y son útiles en la presente invención. Estos se pueden aislar de bacterias, hongos, virus, animales y/o plantas.

Los ejemplos de terminadores adecuados para usar en la presente invención incluyen a el terminador del gen de nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*, el terminador del gen 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV), el terminador del gen de zein de *Zea mays*, las secuencias del terminador del gen de la subunidad pequeña Rubisco (SSU), terminadores d la secuencia del gen de lvirus del enanismo Subclover (SCSV) (Solicitud de Patente Internacional No. PCT/AU95/00552), y el terminador del gen de la enzima málica NSEA3 de *Flaveria bidents* (PCT/AU95/00552).

Los expertos en el arte sabrán de la secuencias adicionales del promotor y terminador adecuadas para usar en la realización de la invención. Tales secuencias se pueden usar fácilmente sin experimentación excesiva.

En la presente invención se describen realizaciones cuando es deseable tener más de un terminador. Los ejemplos de tales realizaciones son aquellos donde las secuencias homosentido y antisentido están contenidas en trascriptos separados (es decir, cada uno tiene su propio extremo 3' y 5').

**Regeneración y propagación de plantas**

Después de la transformación, una planta se puede regenerar, por ej., a partir de células simples, tejido del callo discos de hoja como es estándar en el arte. Casi cualquier planta se puede regenerar por completo a partir de las células, tejidos y

órganos de la planta. Las técnicas disponibles se revisan en Vasil et al. (1984) en Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vols. I, II, and III, Laboratory Procedures and Their Applications (Academic press); y Weissbach et al. (1989) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989.

Durante el desarrollo del cultivo de la suspensión, se forman pequeños agregados de células (10-100 células) aparentemente a partir de agrupamientos celulares más grandes, que dan al cultivo una apariencia dispersa. Después de sembrar estas células en el medio sólido, se puede inducir el desarrollo del embrión somático y estos embriones pueden madurar, germinar y crecer en plantas que portan semillas fértiles. Alternativamente, las células del callo que crecen en un medio de cultivo sólido se pueden inducir para formar embriones somáticos de los cuales se pueden desarrollar la plantas que portan semillas fértiles. Las características de embriogenicidad, regenerabilidad y fertilidad d la planta se pierden gradualmente en función del tiempo en el cultivo de la suspensión. La criopreservacion de las células de la suspensión detiene el desarrollo del cultivo e impide la pérdida de estas características durante el período de criopreservación.

Las plantas transformadas luego pueden crecer y polinizarse con la misma cepa transformada o diferentes cepas, y se identifica la línea resultante que tiene la expresión de las características fenotípicas deseadas. Dos o más generaciones se pueden cultivar para garantizar que la expresión de las características fenotípicas deseadas se mantenga estable y se herede y luego se recogieron las semillas para garantizar que se ha obtenido la expresión de las características fenotípicas deseadas.

Además de una planta, la presente invención proporciona un clon de tal planta, semilla, autofecundada o descendientes híbridos y cualquier parte de estos tales como gajos, polen o semillas. La invención proporciona cualquier propágulo de planta, que es cualquier parte que se pueda usar en la reproducción o propagación, sexual o asexual, que incluye a los gajos, semillas y similares. También están comprendida por la invención una planta que es un linaje , clon o descendencia propagada en forma sexual o asexual de tal planta; o alguna parte o propágulo de dicha planta, linaje, clon o descendencia. También se proporcionan extractos de planta y derivados.

**Apilamiento génico**

Un polinucleótido heterólogo de acuerdo con la presente invención puede comprender una pluralidad de secuencias homosentido y una pluralidad de secuencias antisentido (es decir, un "polinucleótido heterólogo policistrónico"). De este modo, un polinucleótido heterólogo puede proteger a una planta contra plagas múltiples.

Un experto en el arte reconocerá en la actualidad que por, medio de un apilamiento génico, una planta se puede volver resistente a una pluralidad de plagas. La pluralidad de plagas puede provenir del mismo filo de de idferntrs filos. Por ejemplo, una planta se puede volver resistente a una pluralidad de plagas fúngicas. Como un ejemplo no limitante del apilamiento génico de acuerdo con la presente invención, las sojas se pueden volver resistentes a la podredumbre marrón del tallo (*Phialophora gregata*), podredumbre de tallo y raíz (*Phytophthora sojae*), enfermedad del moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*), síndrome de muerte súbita (*Fusarium solani pisi*), y roya asiática (*cPhakopsora pachyrhizi*).

Opcionalmente, una planta se puede volver resistente a una pluralidad de plagas de insectos. Como un ejemplo no limitante del apilamiento génico de acuerdo con la presente invención, las papas se pueden volver resistentes a la chicharrita de la papa (*Empoasca filament*), escarabajo de la papa de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), y pulgón verde del duraznero (*Myzus persicae*).

Opcionalmente, una planta se puede volver resistente a una pluralidad de plagas fúngicas y no fúngicas. Como un ejemplo no limitante del apilamiento génico de acuerdo con la presente invención, las papas se pueden volver resistentes al nematodo dorado de la papa (*Globodera rostochiensis*), escarabajo de la papa de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), y tizón tardío de la papa (Phytophthora infestans).

En una realización de la presente invención, el polinucleótido heterólogo comprende dos secuencias homosentido diferentes y dos secuencias antisentido diferentes.

En una realización de la presente invención, el polinucleótido heterólogo comprende por lo menos tres secuencias homosentido diferentes y tres secuencias antisentido diferentes.

Las plagas de planta con frecuencia provocan que las plantas infectadas se tornen amarillas o marrones, se reduzcan en tamaño, produzcan menos exudados de raíz y maduren mas rápidamente. En consecuencia, controlar una única plaga principal de una planta puede a su vez hacer que la planta sea más susceptible a otras plagas. Si se controla una enfermedad fúngica de una planta, entonces la planta saludable continuará grande y verde durante un período más prolongado y en consecuencia será atractiva y susceptible para los insectos y enfermedades fúngicas de transmisión aérea. La planta verde también puede producir más exudados de raíz que atraerán más nematodos y hongos infectivos de raíz. Se ha descubierto en la presente memoria que puede ser sorprendentemente ventajoso transformar una planta con un polinucleótido heterólogo que contiene secuencias homólogas a una pluralidad de genes de plaga, donde tales genes provienen de plagas de taxones diferentes (por ej. subespecies, especies, géneros, familias, órdenes, clases).

**Reducción de patogenicidad**

Se ha descubierto que cuando una plaga infecta a una célula de planta hospedante transformada de acuerdo con la presente invención, la plaga se vuelve menos patogénica para la célula de planta hospedante transformada y las células hospedante de no planta transformadas. Además, en una realización, una plaga infecta a una célula de planta hospedante transformada de acuerdo con la presente invención y luego las moléculas del silenciamiento génico derivadas de la planta por la alimentación se transmiten posteriormente a través del apareamiento (por ej., por transmisión citoplásmica, conjugación, anastomosis de las hifas, etc.) a poblaciones de la plaga y producen una plaga menos patogénica. De esta manera, las poblaciones de plaga se pueden volver no patogénicas (es decir, menos patogénicas), por ejemplo, por una plaga que es incapaz de multiplicarse y el macroambiente (por ej., suelo, follaje de plantas, desechos de planta, construcciones) contaminado con una plaga se puede proteger o descontaminar del mismo.

Opcionalmente, las progenies de la plaga son menos patogénicas para las células de planta hospedante transformadas y células de no planta hospedante transformadas.

Por consiguiente, una realización de esta invención es un mecanismo para control biológico y tiene gran valor económico ya que se puede usar para eliminar campos de aislados de plagas patogénicas importantes y reducir la aplicación d plaguicidas. En esta realización la planta transgénica transmite los ARNsi a la plaga por medio de comportamiento de alimentación de la plaga y la plaga pierde su patogenicidad debido al posterior silenciamiento de su propio gen de patogenicidad. Además la progenie de la plaga será a su vez no patogénica (por ej., por transmisión citoplásmica, apareamiento, conjugación, anastomosis de hifas), de este modo efectivamente se limpia el ambiente local de esta plaga y se impide o reduce en forma significativa su comportamiento de destructivo de las plantas.

La reducción de patogenicidad, en una realización, se obtiene por co cultivo no patogénico (ya sea transformado directamente o habiendo obtenido los ARNsi), plagas con plagas patogénicas. Tal co-cultivo se logra, a modo de ejemplos no limitante, por transmisión de la plaga transgénica para que crezca e infecte el suelo donde las plagas no patogénicas luego se aparean con especies similares. Tal transmisión se puede obtener por hongos, a modo de ejemplos no limitante, por cultivo de los hongos transformados en semillas de cebada o trigo y luego la distribución de tales semillas en el suelo que requiere la reducción de patogenicidad o protección de las plagas patogénicas.

Esta realización es adecuada para proteger plantas valiosas establecidas tales como árboles (por ej., secoyas, robles, palmeras, arces, etc.).

Si bien la descripción precedente usa patógenos de planta fúngicos como ejemplo, la estrategia de reducción de patogenicidad se puede adaptar a cualquier otra plaga de plantas que pueda transmitir el rasgo "silenciado" a su progenie, como será fácilmente par el profesional experto.

Primero es posible "reducir la patogenicidad" de una plaga por silenciamiento del gen de patogenicidad de la plaga. La plaga luego podría sobrevivir en el ambiente (por ej., suelo) y propagar los ARNsi en toda la población y no atacar más a las plantas. Segundo, por silenciamiento de los genes estructurales principale o genes nutricionales esenciales tales como ARN ribosómicos u genes de elicitina, respectivamente es

posible debilitar o matar un plaga y de este modo se la elimina de los campos de cultivo o reduce si presencia por debajo de los umbrales económicos.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1. Estrategia de clonación**

Los plásmidos pVZA100, pVZA200, pVZA300 y pVZA400 son realizaciones que se diseñaron para la transformación de diversas especies de plantas, que incluyen pero sin limitación a, tabaco (*Nicotiana tobacum*, cv. Xanthi), soja (*Glycine max* cv. Williams 82), papa (*Solanum tuberosm* cv. Alpha) y maíz (*Zea mays* cv. Hi II x B73). El pVZA100 contiene el gen de la cutinasa de longitud completa de la *Phytophthora nicotianae* en las orientaciones homosentido (S) y antisentido (AS), separado por una región espaciadora que contiene una porción (817 pb) del gen de β-glucuronidasa de *E. coli* (GUS) mencionado como dGUS. La expresión del pVZA100 en las plantas está bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV) y el gen de la proteína de la cápside del virus del mosaico del pepino (CMV)de la región no traducida 5' (5' UTR). La señal de terminación también proviene del gen 35S CaMV . El esqueleto del plásmido de pVZA100 es el plásmido de pCAMBIA1201 (**Figura 1**) (Roberts *et al.*, 2000). Su marcador seleccionable de planta es el antibiótico higromicina. La expresión de la higromicin fosfotransferasa en el pCAMBIA 1201 también está controlada por el promotor 35S CaMV y el terminador. El gen indicador del pCAMBIA 1201 es GUS con un intrón de catalasa, también con el promotor 35S CaMV pero con el terminador de nopalina sintetasa (NOS).

**Ejemplo 2. Construcción del plásmido intermediario pVZA1**

A causa de versatilidad, se seleccionó el plásmido de expresión del gen pUC18cpexp (Slightom, 1991) para contener el casete de silenciamiento génico. Este plásmido es pUC18, que contiene el promotor 35S CaMV seguido por el gen de la proteína de la cápside CMV del 5' UTR y la señal de terminación del gen 35S CaMV. Se manipuló genéticamente un sitio Bgl II en el poliligador entre el CMV de 5' UTR y el terminador 35S CaMV. Para obtener dGUS, el plásmido pCAMBIA1201 (**Figura 1**) se digirió dos veces con Nco I y Hinc II. El fragmento GUS de 821 pb de longitud, que

corresponde a los nucleótidos 9540 a 10361 del pCAMBIA1201, se aisló y purificó por electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento luego se digirió (romo) en el sitio 3' Nco I mediante una nucleasa del poroto mung para reducir a 817 pb. Este dGUS de extremos romos luego se repurificó por electoforesis en gel de agarosa y se ligó en el sitio Bgl II del pUC18cpexp para producir el plásmido intermediario pVZA1 (**Figura 2**).

**Ejemplo 3. Construcción de los plásmidos pVZA2, pVZA3, pVZA100, pVZA200, pVZA300 y pVZA400**

El gen de cutinasa de longitud completa del *P. nicotianae* se amplificó en orientación antisentido por la PCR de un clon de cutinasa en el plásmido pZErO-2.1 (Munoz and Bailey, 1998) usando los cebadores VZA 1F (SEC ID NO: 1) y VZA 2R (SEC ID NO: 2) que contienen los sitios de restricción Not I y Nco I respectivamente. Luego se purificó electroforesis en gel de agarosa y se ligó en los sitios Not I y Nco I del plásmido pVZA1. El plásmido resultante, pVZA2, se clonó en *E. coli* y purificó. Una copia del gen de la cutinasa en orientación homosentido se amplificó por PCR del mimos clon de cutinasa en el plásmido pZErO-2.1 usando los cebadores VZA 3F y VZA 4R (SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4, respectivamente) que contienen los sitios de restricción Apa I y Xho I, respectivamente. Se purificó por electroforesis en gel de agarosa y se ligó en los sitios de restricción Apa I y Xho I del plásmido pVZA2 para producir el plásmido intermediario final pVZA3 (**Figura 3**). La porción que contiene dGUS y que separan el gen de la cutinasa en orientación homosentido y antisentido se menciona como la construcción de silenciamiento. La porción que contiene la construcción de silenciamiento más los elementos regulatorios para la construcción (promotor 35S, la 5' UTR y el terminador 35S) se menciona como el casete de silenciamiento (**Figura 3**).

El casete de silenciamiento se escindió del plásmido pVZA3 por doble digestión de restricción con EcoR I e Hind III y se purificó por electroforesis en gel de agarosa. El plásmido pCAMBIA1201 se digirió dos veces con EcoR I e Hind III, y el casete de silenciamiento se ligó en esto sitios para producir el plásmido final de transformación de planta pVZA100. La presencia del casete de silenciamiento completo se confirmó por digestión restricitiva del pVZA100 con PstI (que libera el inserto completo) y por

digestiones con las diversas enzimas de restricción usadas en su ensamblaje. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se compararon con estándares moleculares conocidos. La secuencia, 2201 nt, de la construcción de silenciamiento se confirmó por la secuenciación del ADN, y esta es la SEC ID NO: 5. Los pares de oligonucleótidos siguientes se usaron como cebadores de PCR para detectar la presencia de los genes respectivos en pVZA100 y en plantas transgénicas: cutinasa (SEC ID NOs: 1 y 2, o SEC ID NOs: 3 y 4); GUS (SEC ID NOs: 9 y 10) y higromicin fosfotransferasa (SEC ID NOs: 11 y 12).

Los plásmidos de transformación de la planta pVZA200, pVZA300 y pVZA400 se basaron en el mismo principio como pVZA100. La construcción de silenciamiento fue una repetición invertida del gen de patogenicidad de la plaga seleccionado en ambas orientaciones homosentido y antisentido, separados por el fragmento dGUS. Sin embargo, las construccions de silenciamiento para pVZA200, pVZA300, y pVZA400 se sintetizaron en con equipos comerciales de GenScript Corporation (Piscataway, NJ) con los sitios de restricción ApaI y Not I de los extremos 5' y 3' respectivamente, y se clonaron en el vector pUC57.

La construcción de silenciamiento del pVZA200 contenía los nucleótidos 221 a 820 del ge nde catepsina B (GenBank locus AY702822) del ácaro *Myzus persicae*. Este ácaro es una plaga mayor y el vector más eficiente de muchos virus de plantas. La catepsina B es una cisteína proteasa, una enzima digestiva necesaria para la supervivencia y desarrollo del *Myzus persicae*. La secuencia de 2031 nt de la construcción de silenciamiento para pVZA200 se muestra como la SEC ID NO: 6.

Los elementos regulatorios luego se agregaron a la construcción de silenciamiento del pVZA200 para producir el casete de silenciamiento del pVZA200. Por esto, este casete de silenciamiento del pVZA100 se escindió del pVZA100 por la digestión con EcoR I e Hind III y se purificó por electroforesis en gel de agarosa. Este se clonó en un pUC19 digerido en forma similar. Este plásmido luego se digirió con ApaI y Not I. La porción del pUC19 que contiene los elementos regulatorios del pVZA100 se purificó y ligó a la construcción de silenciamiento de pVZA200 liberado del pUC57 por la digestión con ApaI y Not I. El casete de silenciamiento de pVZA200, actualmente flanqueado por los elementos regulatorios del pVZA100, estaba aumentado en pUC19.

El casete de silenciamiento de pVZA200 completo se escindió del pUC19 por la digestión con EcoR I e Hind III y luego se ligó en los sitios EcoR I e Hind III del pCAMBIA1201 para completar el plásmido de transformación de la planta pVZA200. Como con pVZA100, la presencia del casete de silenciamiento completo se confirmó por digestión restrictiva del pVZA200 con PstI y por digestiones con las diversas enzimas de restricción usadas en su ensamblaje. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se compararon con los estándares moleculares conocidos.

Los pares de oligonucleótidos siguientes se usaron como cebadores de PCR para detectar la presencia de los genes respectivos del pVZA200 y en plantas transgénicas: catepsina (SEC ID NOs: 38 y 39); GUS (SEC ID NOs: 9 y 10) e higromicin fosfotransferasa (SEC ID NOs: 11 y 12).

Los plásmidos de transformación de plantas pVZA300 y pVZA400 se planearon en forma similar y se sintetizaron. La construcción de silenciamiento del pVZA300 fue una construcción génica doble, que contiene secuencias génicas provenientes de dos plagas de plantas diferentes. Este se diseñó para contener la misma repetición invertida del gen de catepsina B alrededor del fragmento dGUS como la construcción de silenciamiento del pVZA200. Pero además, en cada extremo contenía la secuencia codificadora parcial para la elicitina INF1 de *Phytophthora infestans* (GenBank locus AY766228). Este gen de elicitina es requerido por la *Phytophthora infestans* para la patogenicidad y como receptor de esterol ya que la *Phytophthora spp.* no sintetiza los esteroles esenciales para su crecimiento y desarrollo. La secuencia de elicitina tenía de 282 nt de largo. En consecuencia, para obtener una secuencia de aproximadamente 600 nt, la secuencia se repitió para obtener 564 nt.

Un sitio de restricción ApaI se incluyó en el extremo 5' de la secuencia homosentido de elicitina y un sitio de restricción NotI se incluyó en el extremo 3' de la secuencia antisentido de elicitina. La secuencia homosentido de elicitina se agregó al extremo 5' de la secuencia del pVZA200 y la secuencia antisentido de elicitina se agregó al extremo 5' de la secuencia del pVZA200 para completar la construcción de silenciamiento del pVZA300. Esta es de 3159 nt de largo y está compuesta del gen de elicitina y gen de catepsina, ambos en orientación homosentido, seguido por dGUS,

seguido por el gen de catepsina y gen de elicitina, respectivamente, ambos en orientación antisentido.

La secuencia de la construcción de silenciamiento para el pVZA300 s muestra como la SEC ID NO: 7. Esta secuencia se sintetizó por GenScript Corporation y clonó en el vector del pUC57. Los elementos regulatorios lueg ose agregaron como se describe para el pVZA200 para completar el casete de silenciamiento para pVZA300, y este se clonó en los sitios EcoR I e Hind III del pCAMBIA1201. Como previamente, la presencia del casete de silenciamiento completo se confirmó por digestión restrictiva del pVZA300 con PstI y por digestiones con las diversas enzimas de restricción usados en su ensamblaje. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se compararon con estándares moleculares conocidos. Los pares de oligonucleótidos siguientes se usaron como cebadores de PCR para detectar la presencia de los genes respectivos en el pVZA300 y en plantas transgénicas: elicitina y superposición de catepsina (SEC ID NOs: 40 y 39) catepsina (SEC ID NOs: 38 y 39); GUS (SEC ID NOs: 9 y 10) e higromicin fosfotransferasa (SEC ID NOs: 11 y 12).

La construcción de silenciamiento del plásmido de transformación de planta pVZA400 contenía los nt 1-600 de los genes del ARN ribosómico (ADNr) de *Phytophthora infestans* (GenBank locus AJ854293) en las orientaciones homosentido y antisentido, respectivamente, separados por dGUS. Un sitio de An ApaI y NotI se incluyeron en los extremos 5' y 3', respectivamente. La secuencia de la construcción de silenciamiento (2031 nt) para pVZA400 se muestra en la SEC ID NO: 8. Esta se sintetizó por GenScript Corporation y se clonó en el vector pUC57. Los elementos regulatorios luego se agregaron como se describe para pVZA200 para completar el casete de silenciamiento para pVZA400, y este se clonó en los sitios EcoR I e Hind III del pCAMBIA1201. Como previamente, la presencia del casete de silenciamiento completo se confirmó por digestión restrictiva del pVZA400 con PstI y por digestiones con las diversas enzimas de restricción usados en su ensamblaje. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se compararon con estándares moleculares conocidos.

Los pares de oligonucleótidos siguientes se usaron como cebadores de PCR para detectar la presencia de los genes respectivos del pVZA400 y en plantas

transgénicas: ADN ribosómico (SEC ID NOs: 41 y 42); GUS (SEC ID NOs: 9 y 10) e higromicin fosfotransferasa (SEC ID NOs: 11 y 12).

**Ejemplo 4. Métodos de transformación**

Las células de planta (que incluyen tabaco, soja, papa y maíz) se transformaron con plásmidos de transformación pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300, y pVZA400 usando biolísticos o con pVZA100 usando la cepa PGV 2260 de *Agrobacterium tumefaciens.* Los cultivos fúngicos se transformaron solo por biolisticas con plásmidos de transformación pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300, y pVZA400.

La preparación de microproyectiles de tungsteno u oro para bombardeo con el dispositivo biolístico conducido por helio estaba de acuerdo con el protocolo de Shark *et al.* 1991. Los microproyectiles se cubrieron con tanto pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300, pVZA400, o con no ADN. Para la transformación del cultivo de tejido de planta y fúngico, el aparato Dupont PDS-1000 se usó al vacío (23 mm Hg) y a 1200 PSI con tejidos a 8 y 12 cm de la placa de detención. Para la transformación de semillero y plántula, se usó una pistola de partículas casera de uso manual a 200 PSI, y se mantuvo tan cerca como es posible del meristemo en desarrollo.

Las transformaciones con *Agrobacterium tumefaciens* se realizaron esencialmente como se describe en Rogers et al. (1987). Si bien la biolística y transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se usan para ejemplificar esta porción del tema de la invención, se podría usar cualquier método de introducir ADN heterólogo en células blanco con propósitos de transformación que se conoce en el arte, como será apreciado fácilmente por el profesional experto y se deberá optimizar de acuerdo con las especies blanco.

**Ejemplo 5. Transformación de tabaco con pVZA100 y regeneración**

Los cultivos del callo organogénico de *Nicotiana tabacum* cv Xanthi se mantuvieron en cultivos con agitación en el laboratorio y se transfirieron en forma mensual al medio fresco MS (Murashige y Skoog, 1962). Los callos se retiraron de los matraces en forma aséptica, se filtraron libre de líquido y se esparcieron en un papel de filtro en una placa de Petri plástica estéril. Estos se bombardearon con el pVZA100 de

acuerdo con los métodos descriptos anteriormente y el papel de filtro se transfirió al medio MS libre de fitohormona durante toda la noche. El día siguiente se transfirió el papel de filtro al medio MS que contiene 1 mg/l de 6-benciladenina, 0,1 mg/l de ácido acético naftalina, 1 mg/l de tiamina-HCl, 100 mg/l de inositol, 30 g/l de sacarosa, 6 g/l de fitagar y 30ug/ml de higromicina para la selección de las células transgénicas. Para la regeneración, los callos en expansión se transfirieron al medio fresco MS cada 2 semanas. Los brotes emergentes luego se transfirieron al medio MS sin fitohormonas para formar las raíces. Las plántulas enraizadas se transfirieron al suelo o se examinaron directamente para determinar la resistencia a *P. nicotianae.* Las plantas se cultivaron para la madurez en suelo y se recogieron semillas para posterior análisis.

**Ejemplo 6. <u>Transformación fúngicas y protocolos de selección</u>**

Se bombardearon cinco discos de micelios de *Phytophthora nicotianae, P. sojae* y *P. infestans* acuerdo con los métodos y las contriciones descriptas en los Ejemplos 3 y 5. Los cultivos bombardeados se colocaron en placas de agar V-8 y se incubaron a 27C durante toda la noche. El día siguiente estos se transfirieron a placas de agar V-8 que contienen 400 ug/ml de higromicina y se incubaron a 27C durante 3-4 días. Los discos se cortaron (5 mm) del nuevo cultivo y se transfirieron a placas de Petri con 15 ml de caldo V-8 y se incubaron a 27C durante 2 días. Las matas miceliales se lavaron con agua estéril, se prensaron en seco y se incubaron durante 2 días con 10 ml de extracto de suelo para inducir la formación de esporangios. Para inducir la liberación de zoosporos, las matas se clocaron en agua desmineralizada estéril y se enfriaron a 4C durante 30-60 min. Las zoosporas se recogieron por centrifugación durante 5 min. a 5.000 g y 4C. Para la selección, se ajustó la concentración de zoospora a aproximadamente 1.000/ml y se sembró en agar V-8 que contiene 400 ug/ml de higromicina y X-gluc (Jefferson *et al.*, 1986) y se incubó durante varios días a 27C.

Estas cepas se transformaron en forma estable con el gen GUS en el pCAMBIA1201 presente en el agar X-gluc como colonias azules pequeñas originadas de zoosporas simples. Estas se transfirieron a placas individuales de agar V-8 que contiene 400 ug/ml de higromicina y los cultivos se tiñeron consistentemente de azul, positivo para GUS, después de muchas transferencias. Estas cepas se transformaron

232
232

con los plásmidos de silenciamiento pVZA100, pVZA200, pVZA300, y pVZA400, también incisamente presentes como pequeñas colonias azules originadas de zoosporas simples. Estas se transfirieron a placas de agar V-8 que contiene 400 ug/ml higromicina y X-gluc. Después de 2-3 transferencias en este medio, las colonias que sobrevivieron se tronaron blancas, lo cual indica que el gen GUS ha sido silenciado. Todos los cultivos se mantuvieron a 27C y transfirieron mensualmente al medio fresco.

**Ejemplo 7. Transformación de maíz, soja y papa**

El maíz se transformó por bombardeo del callo Tipo II del germoplasma Hi II con partículas de oro recubiertas con dos plásmidos, pVZA100 y pBAR184 (Frame et al., 2000). El pBAR184 se incluyó para que los co-transformants se puedan seleccionar y regenerar en medio que contiene el herbicida bialafos más que higromicina. Los callos se cultivaron y seleccionaron en un medio basado en N6 que contiene 2 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y de bialafos. Para la regeneracion y enraizamiento, los embriones se transfirieron al medio MS mque contiene 2 mg/l de bialafos y no fitohormonas. Las plántulas enraizadas se ensayaron por PCR.

La soja se transformó por *Agrobacterium tumefaciens* y biolística. Los embriones maduros se escindieron en forma aséptica a partir de las semillas hidratadas de soja Williams. Luego los embriones se sumergieron durante 15 min. en unos pocos mililitros de un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* que había sido cultivado en un agitador durante toda la noche a 28C y contenía tanto pCAMBIA1201 como pVZA100. Los embriones tratados se colocaron en un medio MS que contiene 15 mg/l de higromicina y fitohormonas (BAP y NAA) y luego medio MS libre de fitohormonas para el enraizamiento. Se formaron estructuras semejantes a embriones y germinaron y luego se produjeron las hojas (Figura 6), pero las plantas no se regeneraron y enraizaron, a pesar del ensayo en muchos medios. La transformación biolistica de la soja se realizó mediante la pistola de partículas casera manual. Las plántulas de 8-10 días y 6-10 cm de alto se bombardearon con partículas de oro recubiertas con pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300 o pVZA400 o con no ADN. Las plantas se cultivaron en el invernadero y ensayaron por PCR. La semilla madura se recogió y ensayó para determinar la resistencia a P. *sojae*.

233
133

La papa se transformó por *Agrobacterium tumefaciens* y biolistica. Las papas Russett Burbank y Alpha se transformaron por *Agrobacterium tumefaciens*. Los tubérculos se desinfectaron en la superficie, y se escindieron los "ojos" de la papa y se sembraron en un medio MS sólido sin fitohormonas. Los ojos germinaron y se produjeron plántulas por corte de una sección del nudo que contenía una hoja y se colocó el tallo en medio MS fresco. Las plántulas enraizadas de 5-7 cm alto se produjeron en 10-15 días. Se retiraron las hojas de las plántulas y los tallos se cortaron en porciones de 1 cm de largo. Las porciones se sumergieron como antes durante 15 min en unos pocos mililitros de un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* que había sido cultivado en un agitador durante toda la noche a 28C y contenía tanto pCAMBIA1201 como pVZA100. Las porciones se transfirieron a un papel de filtro estéril y se siguió el procedimiento del cultivo tisular de Cearley y Bolyard (1997). Se produjeron estructuras tipo tubérculo bulboso y tipo raíz (Figura 8), pero las plantas no se regeneraron y enraizaron, a pesar del ensayo en muchos medios. Para la transformación biolistica, las plántulas de papa de 3-5 cm de alto se trasplantaron al suelo. Después de 2-3 días se bombardearon mediante la pistola de partículas casera manual y partículas de oro recubiertas con pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300 o pVZA400 o con no ADN. Las plantas se cultivaron en el invernadero y ensayaron por PCR y para sus reacciones con ácaros y *P. infestans*.

**Ejemplo 8. <u>Extracción de ADN y ARN de tejidos de planta y hongos y protocolos de PCR y RT/PCR</u>**

El ADN total se extrajo del tejido de hoja del tabaco y micelio de *Phytophthora nicotianae* por el método de Dellaporta et al., 1983. Usualmente una muestra de 100 mg de tejido congelado se molió a un polvo fino en un tubo de microcentrifuga que contiene nitrógeno líquido y luego se homogeniza en un 500 ul de buffer de extracción con un mortero de acero inoxidable que funciona a motor.

El ARN total para las reacciones de RT/PCR se extrajo del tejido de hoja y micelio fúngico por el método TRIzol de Invitrogen. Usualmente 100 mg de tejido se congelaron en nitrógeno líquido en un tubo de microcentrífuga de 1,8 ml. Este se molió a un polvo fino y luego se homogenizó en 1,0 ml de TRIzol con un mortero que funciona

a motor. La mezcla se dejó incubar durante 5 min. a temperatura ambiente. Luego se agregaron 200 ul de cloroformo y se mezclaron por agitación en vórtex. La suspensión se incubó 5 min. a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min. a 4 C. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio, se agregaron 500 ul de isopropanol y las muestras se mezclaron e incubaron 10 min. a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron otra vez durante 10 min. a 4 C, y se descartó el sobrenadante. El pellet se enjuagó una vez con 250 ul de 75% de etanol por agitación con vórtex y centrifugación 5 min. a 4 C. El pellet de ARN se secó al aire brevemente y se disolvió en 20 ul de agua libre de ARNasa y se conservó a -70 C hasta el uso Un método similar se usó para las preparaciones mas grandes de ARN total para la detección del ARNsi. Usualmente 1 gramo de hoja o micelio fúngico congelado se molió a un polvo fino en nitrógeno líquido y se homogenizó con 15 ml de reactivo TRIzol. Luego se agregaron 3 ml de cloroformo e incubaron como antes. El sobrenadante se recuperó por centrifugación y el ARN precipitó con 1/2 volumen de isopropanol. El pellet se lavó con 75% de etanol, se secó al aire y resuspendió en 80 ul de agua libre de ARNasa.

Las reacciones de PCR para los tejidos de plantas y hongos se realizaron esencialmente como se describe en Munoz y Bailey, 1998, excepto que los volúmenes de reacción totalizaron 50ul. Las reacciones contenían buffer de PCR 1X (solución 10X: 500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl pH 9,0, y 1% de Triton X-100), 2,5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada trifosfato de desoxirribonucleótido (dNTP), 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq (Invitrogen or Promega), 100 pmol del cebador de oligonucléotidos primario y reverso apropiados (ver SEC ID NOs:), 1-10 ul de templado y suficiente agua desionizada para igual a 50ul. Las preparaciones de ADN usadas como templados se diluyeron usualmente a razón de 50 ng por microlitro y se usó 1 microlitro como templado.

Las condiciones de la reacción de PCR se estandarizaron excepto para la temperatura de apareamiento, que varió de acuerdo con la Tm de los cebadores de olgonucleótidos para que el gen se amplifique. Las condiciones estandarizadas fueron de 94C durante 2 min. para la fusión, seguido por 40 ciclos de 1 min. a 94C, 1 min. a la temperatura de apareamiento y 2 min. a 72C para la elongación. Después de 40 ciclos

hubo 10 min. de elongación a 72C, y las reacciones se mantuvieron a 4C hasta el ensayo.

Las reacciones de RT/PCR se llevaron a cabo en 3 pasos separados, tratamiento con ADNsa, transcripción reversa y luego PCR, como recomienda Invitrogen. El tratamiento con ADNsa se realizó para eliminar cualquier ADN transferido en la purificación del ARN para garantizar que se transcriba solo ARN mensajero y no ADN genómico. La mezcla de ADNsa contenía por reacción: 3 ug de ARN , 1 ul de buffer de ADNsa 10X, 2 ul de ADNsa I, 0,5 ul de ARNasa OUT y agua (librede ARNsa) a un volumen final de 10ul. Esto se incubó a 26C durante 30 min. Luego se agregaron 6,5 ul de EDTA 25mM por tubo y se incubó durante 15 min. a 65C.

Para las reacciones de la transcriptasa reversa (RT) se preparó una mezcla de Mix I y Mix II. La Mix I contenía por reacción: 1 ul de dNTP, 4 ul de buffer RT 5X, y 2 ul de ditiotreitol. La Mix II contenía por reacción: 0,5 ul de ARNsa OUT, 1 ul de transcriptasa reversa y 1 ul de agua. Los cebadores de oligonucléotidos apropiados (cada 1 ul de agua) se colocaron en los tubos apropiados y se agregaron la Mix I y II en forma apropiada. La Mix I se colocó en cada tubo, la Mix II en los tubos numerados impares y 2,5 ul de agua en los tubos numerados pares; luego se agregaron 10 ul de ARN tratado con ADNsa a cada tubo. Las reacciones RT se incubaron a 42C durante 60 min, y luego a 70C durante 15 min.

**Ejemplo 9. <u>Detección de los ARNsi en tejidos de planta y hongos</u>**

El procedimiento fue descripto esencialmente por Hutvagner *et al.*, 2000. El ARN total se extrajo de la hojas de tabaco o micelios fúngicos como antes. Este se cuantificó en un espectrómetro a 260nm y se fraccionaron 80 ug por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante con 15% de geles durante 2,5 horas a 0,025 Amp. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se fotografiaron y el ARN se transfirió a hybond N+ (Amersham) durante 1 hora a 10 voltios a 4 C. La hibridación se realizó como se describe en Sambrook *et al.* (1989) por transferencia Northern.

La sonda se transcribió a partir del producto de PCR de 500 pb del gen de cutinasa y se marcó con $^{32}P$ por cebadura al azar. Las membranas se prehibridizaron 1 hora a 50 C con solución del buffer HYBAID de Amersham y se hibidizó durante por lo

menos 16 horas a 50 C. Los lavados se realizaron dos veces con 5X SSC a temperatura ambiente. Las señales de hibridación se detectaron por autorradiografía, mediante un escáner de Storm 860 para analizar imágenes de Molecular Dynamics.

**Ejemplo 10. Tinción de GUS de los tejidos de planta y hongos**

Preparación del sustrato X-GLUC: Para 200 ml, se coloca en un vaso de precipitado 150 ml de agua destilada y se agregan los siguientes componentes: Buffer de fosfato de sodio pH 7,0 (1 M), 20 ml, EDTA pH 8,0 (500 mM), 4ml, ferrocianuro de potasio K4Fe(CN)6,3 H2O, 0,042g, Triton X-100 0,2 ml. Se agita durante 10 min. Se ajusta el pH 7,0 con NaOH. Se disuelven 100 mg de X-GLUC en 2 ml de DMSO o dimetil-formamida. Se agrega el X-GLUC en DMSO al vaso de precipitado. Se filtra para esterilizar la solución, se dispensa en 10 ml alícuotas y se conserva a -20C. Para la incorporación en el medio de crecimiento, se agregan 100 mg del polvo X-GLUC disuelto en DMSO en 250 ml de agar V8 se enfría y está preparado para dispensar en las cepas de hongos en el medio MS para los materiales de planta.

Procedimiento de tinción: se agrega suficiente solución de X-GLUC para cubrir el pequeño explante de tejido de planta y se incuba a 37C durante 3-24 horas. Para las cepas de hongos o materiales de planta en placas de agar X-gluc, se incuba a 24-27 C durante 3-24 horas.

Este procedimiento es esencialmente como describe en Jefferson, et al., 1986.

**Ejemplo 11. Ensayos de inoculación de planta con hongos**

Se ensayaron tres métodos para inocular tabaco con *P. nicotianae.* Todos dieron resultados satisfactorios, pero el método del palillo es el más riguroso y fiable.

1. Método del palillo: este método fue provisto por el Dr. A. Csinos (comunicación personal). Los palillos redondos de madera se quebraron a la mitad y se autoclavaron en caldo V-8. Los palillos estériles se colocaron horizontales en placas de agar V-8 y 6-8 discos de micelios (5 mm de diámetro) de *P. nicotianae* se separaron en forma equidistante en la placa. Las placas se incubaron a 27C durante por lo menos 2 semanas, cuando las clamidosporas se volvieron evidentes por examen microscópico. La inoculación de la planta se obtiene al colocar 1 o 2 palillos en el suelo próximo a la corona de la planta. Las plantas se cubrieron con una capa plástica para mantener la

237
237

humedad relativa a 100% y se incubaron a 27C. Los síntomas usualmente fueron evidentes después de 2-4 días y las plantas susceptibles usualmente murieron después de 5-8 días. Las reacciones de las plantas transgénicas resistentes varían de asintomáticas a la producción de lesiones del tallo restringidas de 1-4 cm de largo, que no interfieren con el crecimiento de plantas y posteriormente el desarrollo de flores y semillas.

2. El método de inmersión del micelio: Los micelios de *P. nicotianae* se cultivaron durante toda la noche a 27C en caldo V-8. Las plántulas o plantas transgénicas del suelo se lavaron libres del medio y se colocaron en 100 ml de agua desionizada esteril. Las matas de micelio se trituraron con fórceps y se agregaron al agua. Las plantas se cubrieron con una capa plástica para mantener la humedad relativa a 100% y se incubaron a 27C. Los síntomas usualmente fueron evidentes después de 2-4 días y las plantas susceptibles usualmente murieron después de 5-8 días. Las raíces y corona de la plantas susceptible se maceraron completamente (Figura 11A). Las raíces de las plantas transgénicas parecen estar "quemadas" en las puntas (Figura 11B), o presentaban lesiones definidas en la corona, pero esto no interfiere en el crecimiento de la plantas y posteriormente el desarrollo de flores y semillas después de las plantas se plantaron en la tierra.

3. Inoculación de zoospora: Se produjeron esporangios por la colocación de tiras en hojas de tabaco esterilizadas en la superficie en cultivos de crecimiento de *P. nicotianae* a 27C en caldo V-8 durante toda la noche. Se liberaron millones de zoosporas, por la colocación de las matas en agua desmineralizada estéril y se enfriaron a 4C durante 30-60 min. Las zoosporas se recogieron por centrifugación durante 5 min. a 5.000 g y 4C.

Las plantas de soja se inocularon con *P. sojae* por dos métodos diferentes. Las plántulas se inocularon por medio de un corte de un cilindro de 3 mm de un cultivo en crecimiento activo en agar V8 con un perforador de corcho y la colocación del cilindro en la axila de un hipocótilo. El inóculo se mantuvo en el lugar con Parafilm, y las plantas se colocaron en una bolsa de plástico para dar 100% de humedad. Se inocularon las hojas de soja con *P. sojae* por la colocación de una hoja en una placa de Petri con 10 ml de agua estéril y el agregado de 1 o 2 tapones de inóculo como antes.

Las hojas de papa se inocularon con *P. infestans* por la colocación de una hoja en una placa de Petri con 10 ml de agua estéril y el agregado de 1 o 2 tapones de inóculo como antes o por la colocación de 10 ul de una suspensión de zoosporas por folíolo.

En todas las pruebas de inoculación, las reacciones de la planta o hoja se leyeron y registraron diariamente hasta que las plantas u hojas inoculadas dejaron de morir o no mostraron evidencia de la infección.

**Ejemplo 12. Caracterización molecular de las plantas de tabaco resistentes a P. nicotianae**

Se extrajeron ADN y ARN de las plantas transformadas de la generación T0 y T2 del Ejemplo 27. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) y las pruebas de transcripción reversa /PCR (RT/PCR) se realizaron en las muestras de ADN y ARN, respectivamente. Las reacciones de PCR se realizaron para determinar la presencia de los transgenes de las plantas. Las reacciones RT/PCR se realizaron para determinar si los transgenes se estaban expresando o habían sido silenciados. Los resultados fueron iguales para ambas generaciones T0 y T2 u se sintetizan en la Tabla 8.

**Tabla 8. Detección del gen y expresión de las plantas de tabaco transgénicas y tipo salvaje**

| | Higromicin fosfotransferasa | | GUS | |
|---|---|---|---|---|
| **Tejido ensayado** | **PCR** | **RT-PCR** | **PCR** | **RT-PCR** |
| Tabaco tipo salvaje | - | - | - | - |
| Tabaco + pCAMBIA1201 | + | + | + | + |
| Línea transgénica 4 del pVZA100 | + | + | + | - |
| Línea transgénica 23 del pVZA100 | + | + | + | - |
| Línea transgénica 26 del pVZA100 | + | + | + | - |
| Línea transgénica 27 del pVZA100 | + | + | + | - |
| ADN del plásmido del pVZA100 | + | na | + | na |
| | **Cutinasa** | | **ARN ribosómico 16S** | |
| **Tejido ensayado** | **PCR** | **RT-PCR** | **PCR** | **RT-PCR** |
| Tabaco tipo salvaje | - | - | + | + |
| Tabaco + pCAMBIA1201 | - | - | + | + |
| Línea transgénica 4 del pVZA100 | + | - | + | + |
| Línea transgénica 23 del pVZA100 | + | - | + | + |
| Línea transgénica 26 del pVZA100 | + | - | + | + |
| Línea transgénica 27 del pVZA100 | + | - | + | + |
| ADN del plásmido pVZA100 | + | na | - | na |

+ = Positivo (banda del gel) - = Negative (banda no gel) na = No aplicable

En el panel superior de la **Tabla 8,** los datos de la primer columna demuestran que el gen de resistencia a higromicina (higromicin fosfotransferasa) no estaba presente en las plantas de tabaco tipo salvaje, pero estaba presente en todas las plantas transformadas con el plásmido pCAMBIA 1201 solo o con pVZA100. Los datos de la segunda columna demuestran que el gen de higromicina estaba expresado en todas las plantas en las cuales estaba presente. Los datos de la tercer columna demuestran que el gen GUS no estaba presente en las plantas de tabaco tipo salvaje, pero estaba presente en todas las plantas transformadas con el plásmido pCAMBIA 1201 solo o con pVZA100. Los datos de la cuarta columna demuestran que el gen GUS estaba expresado solo en las plantas transformadas pCAMBIA 1201, donde no estaba presente la construcción de silenciamiento de GUS. Sin embargo, el GUS se silenció en todas las plantas transgénicas que contienen la construcción de silenciamiento del pVZA100.

En el panel inferior de la **Tabla 8**, los datos de la primer columna demuestran que el gen de la cutinasa fúngica no estaba presente en las plantas de tabaco de tipos salvaje, ni en las plantas transformadas con el plásmido pCAMBIA 1201 solo. Sin embargo, este estaba presente en todas las plantas transformadas con el pVZA100. Los datos de la segunda columna demuestran que el gen de la cutinasa fúngica no estaba expresada en las plantas de tipo salvaje ni en las plantas transformadas con el plásmido pCAMBIA 1201 solo o con el pVZA100. Los datos de al tercer columna demuestran que el gen del ARN ribosómico 16S estaba presente en las plantas de tipo salvaje y todas las plantas de tabaco transgénicas, pero no en la construcción de silenciamiento. Los datos de la cuarta columna demuestran que el gen del ARN ribosómico 16S estaba expresado en todas las plantas de tabaco, sean de tipo salvaje o transgénico.

Cuando las plantas de tabaco de tipo salvaje o las transformadas con el pCAMBIA1201 se inocularon con *P. nicotianae*, estas fueron siempre susceptibles, mientras que las transformadas con el pVZA100, tal como las líneas transgénicas 4, 23, 26 y 27 fueron resistentes (Figura 11 A y B, respectivamente).

**Ejemplo 13. Transformación y caracterización fúngica**

Diferentes cultivos de *P. nicotianae* o *P.sojae* se bombardean con pCAMBIA1201, pVZA100, pVZA200, pVZA300, o pVZA400 como se describió anteriormente y los cultivos de zoosporas simples se producen a partir de cultivos viables.

Estos cultivos de *P. nicotianae* bombardeados con pCAMBIA1201 y pVZA100 se examinaron para determinar la patogenicidad del tabaco Xanthi tipo salvaje normalmente susceptible. Estos cultivos transformados con el pCAMBIA1201 continuaron patogénicos, mientras que estos cultivos transformados con el pVZA100 fueron no patogénicos. Los cultivos de tipo salvaje y transgénicos de *P. nicotianae* se cultivaron en medio V8 líquido y los ADN y ARN se extrajeron como se describió anteriormente. Estas muestras se analizaron por PCR y RT/PCR como antes. Los resultados se sintetizan en la Tabla 9.

**Tabla 9. Detección génica y expresión de la *Phytophthora nicotianae* transgénica y tipo salvaje**

| | **Higromicina fosfotransferasa** | | **GUS** | |
|---|---|---|---|---|
| **Tejido ensayado** | **PCR** | **RT-PCR** | **PCR** | **RT-PCR** |
| *P. nicotianae* tipo salvaje | - | - | - | - |
| *P. nicotianae* + pCAMBIA 1201 | + | + | + | + |
| *P. nicotianae* + pVZA100 | + | + | + | - |
| ADN del plasmado del pVZA100 | + | na | + | na |
| | **Cutinasa** | | **ARN ribosómico 16S** | |
| **Tejido ensayado** | **PCR** | **RT-PCR** | **PCR** | **RT-PCR** |
| *P. nicotianae* tipo salvaje | + | + | + | + |
| *P. nicotianae* + pCAMBIA 1201 | + | + | + | + |
| *P. nicotianae* + pVZA100 | + | - | + | + |
| pVZA100 plásmido ADN | + | na | - | na |

+ = Positivo (banda del gel) - = Negativo (banda no gel) na = No aplicable

En el panel superior de la **Tabla 9,** los datos de la primer columna demuestran que el gen de higromicina fosfotransferasa no estaban presentes en la *P. nicotianae* tipo salvaje, pero estaba presente en los cultivos de *P. nicotianae* transformados con el plásmido pCAMBIA 1201 solo o con el pVZA100. Los datos de la segunda columna demuestran que el gen de higromicina fosfotrasanferasa estaba expresado entonos los cultivos en los cuales estaba presente.

Los datos de la tercer columna demuestran que el gen GUS no estaba presente en la *P. nicotianae* tipo salvaje, pero estaba presente en los cultivos de *P. nicotianae* transformados con el plásmido pCAMBIA 1201 solo o con el pVZA100. Los datos de la cuarta columna demuestran que el gen GUS esta siendo expresado solo en la *P. nicotianae* transformado con el pCAMBIA 1201, donde no estaba presente la construcción de silenciamiento del GUS. Sin embargo el GUS fue silenciado en todos los cultivos transgénicos de *P. nicotianae* que contienen la construcción de silenciamiento del pVZA100.

En el panel inferior de la **Tabla 9,** los datos de la primer columna demuestran que el gen de la cutinasa fúngica estaba presente en la *P. nicotianae* tipo salvaje, además de los cultivos transformados con el plásmido pCAMBIA 1201 solo o con la construcción de silenciamiento del pVZA100, ya que el gen de la cutinasa es un gen constitutivo de la *P. nicotianae*. Los datos de la segunda columna demuestran que el gen de la cutinasa fúngica estaba expresado tanto en la *P. nicotianae* de tipo salvaje como en los cultivos transformados con el plásmido del pCAMBIA 1201. Sin embargo la expresión de cutinasa estaba silenciada en los cultivos de *P. nicotianae* transformados con la la construcción de silenciamiento del pVZA100.

Los datos de la tercer columna demuestran que el gen del ARN ribosómico 16S estaba presente *P. nicotianae* tipo salvaje y en todas las transgénicas, pero no en la construcción de silenciamiento. Los datos de la cuarta columna demuestran que el ARN ribosómico 16S estaba siendo expresado en los cultivos de *P. nicotianae* tipo salvaje y transgénicos.

El examen microscópico de los cultivos de *P. nicotianae* y *P.sojae* bombardeados con el pCAMBIA1201, pVZA100 y pVZA200 indicaron que todo creció normalmente como en la de tipo salvaje y sin malformaciones visuales (Figura 14 A). Se observaron

resultados similares para los cultivos de *P. nicotianae* reaislados de tabaco tipo salvaje infectado o tabaco transformado con el pVZA100. Sin embargo, estos cultivos de *P. nicotianae* bombardeados con el pVZA300 o pVZA400 (Figura 14 B, C, D) y los de *P.sojae* también bombardeados con el pVZA300 o pVZA400 (Figura 14 E, F) crecieron muy lentamente, sus hifas estaban gravemente malformadas y algunos cultivos murieron.

La transformación de *P. nicotianae* y *P. sojae* con el pCAMBIA1201 y pVZA200 no tuvo efectos perjudiciales sobre los hongos ya que estos plásmidos no contienen genes fúngicos y no pueden inducir el silenciamiento de estos hongos. Además, la transformación de *P. nicotianae* y *P. sojae* con el pVZA100, que contiene el gen de la cutinasa de la *P. nicotianae*, les permitió crecer normalmente, pero provocó que ambas especies se convirtieran en no patogénicas, debido a que el gen de la cutinasa, que es esencial para la patogenicidad, fue silenciado por pVZA100.

La transformación de *P. nicotianae* y *P. sojae* con el pVZA300 o pVZA400, que contienen los genes de la elicitina de *P. infestans* y ARN ribosómico, respectivamente, presentaron efectos perjudiciales marcados sobre el crecimiento y desarrollo de la *P. nicotianae* y *P. sojae.* Hubo crecimiento insuficiente incluso para proporcionar un inóculo suficiente para las pruebas de patogenicidad. Esto sugiere que los genes de la elicitina y ARN ribosómico estaban silenciados en los hongos transformados y que el silenciamiento de estos genes importantes es muy perjudicial o letal para los hongos. Esto también está avalado por el hecho de que ambos pVZA 200 y pVZA300 contienen el gen de la catepsina del *Myzus persicae*. Pero además, el pVZA300 contiene el gen de elicitina de *P. infestans*. Debido a que el pVZA200 no causó efectos visible y el pVZA300 causó efectos perjudiciales, el gen de elicitina parece ser el responsable de la malformación causada por el pVZA300.

Como se describió anteriormente, cuando la cutinasa de la *P. nicotianae* indujo resistencia e al planta a otras especies de *Phytophthora*, estos resultados demuestran que los genes esenciales de una especie de *Phytophthora* (*P. infestans*), cuando se introducen en las construcciones de silenciamiento puedne causar efectos muy perjudiciales en otras especies de *Phytophthora* (*P. nicotianae* y *P. sojae*), los cuales

deberían ser útiles para controlar la *Phytophthora spp.* directamente en las plantas o por reducción de la patogenicidad de suelos y campos infestados.

**Ejemplo 14. Demostración de silenciamiento génico en tabaco por la detección del ARNsi**

Otra prueba de que se está produciendo el silenciamiento génico es la detección de los ARN interferentes pequeños (ARNsi) en las plantas transformadas supuestamente silenciadas (Ejemplos 5 y 13) y los hongos transformados (Ejemplo 13). Los ARNsi son 21 a 25 nucleótidos (nt) de longitud, con homología con el ARNm que esta siendo "silenciado".

El ARN total se extrajo de las plantas de tabaco de generación T0 y T1 de tipo salvaje y transgénica supuestamente silenciadas y de *P. nicotianae* supuestamente silenciada. El ARN se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida, se transfirió a una membrana y se hibridizó con una sonda transcripta de un producto de PCR de 500 pb del gen de la cutinasa y se marcó con $^{32}P$ por cebadura al azar. Las condiciones de hibridación y detección fueron las del Ejemplo 9 anterior.

Las **Figuras 4a y 4b** muestran los resultados de la hibridación e la sonda del gen de la cutinasa para los ARN de las plantas de tabaco de tipo salvaje y la *P. nicotianae* transgénica. En la **Figura 4a**, la calle 1 muestra la hibridación a una mezcla de los 35 nt de los oligonucleótidos de VZA 3F (SEC ID NO: 3) y VZA 4R (SEC ID NO: 4). Estos se usaron para cebar la reacción de PCR para sintetizar el templado para la producción de la sonda. En consecuencia, estas son completamente homólogas al templado, y también de tamaño molecular conocido. Las calles 2 y 3 contienen ARN de las plantas de tabaco de tipo salvaje. No exite hibridación ya que ni el gen de la cutinasa ni la construcción de silenciamiento están presentes en las plantas de tipo salvaje, por lo tanto no se producen los ARNsi. Las calles 4 a 11 contiene el ARN de las plantas de la generación T0 y T1 de las líneas transgénicas 4, 23, 26 y 27. La hibridación demuestra la presencia de los ARNsi en cada una de las plantas transgénicas, lo que indica la degradación del ARNm de la cutinasa y el silenciamiento concomitante del gen de la cutinasa en las plantas transgénicas.

En la **Figura 4b**, la calle 1 otra vez muestra la hibridación a un mezcal de los 35 nt de los oligonucleótidos VZA 3F y VZA 4R. La calle 2 muestra la hibridación al ARN de la *P. nicotianae* tipo salvaje. La mancha intensa de 620 nt de longitud corresponde al transcripto de longitud completa del gen de la cutinasa en *P. nicotianae* tipo salvaje. El gen de la cutinasa es constitutivo en este cultivo y la construcción de silenciamiento no está presente. En consecuencia, el transcripto del ARNm de longitud completa sobrevive y no se digiere a los ARNsi. Las calles 3 a 6 contienen el ARN de cuatro cultivos de *P. nicotianae* transformados con la construcción de silenciamiento. La hibridación de muestra la presencia de los ARNsi de cada uno de los cultivos transgénicos de *P. nicotianae*, lo cual indica la degradación del ARNm de la cutinasa y el silenciamiento concomitante del gen de la cutinasa en las *P. nicotianae* transgénica.

La evidencia biológica para el silenciamiento del gen esencial de la cutinasa en *P. nicotianae* transgénica proviene del hecho de que estos cultivos transformados con la construcción de silenciamiento génico de la cutinasa, pVZA100, se convierten en no patogénicos, mientras que estos cultivos transformados con el plásmido pCAMBIA 1201 solo continúan igualmente patogénica a los cultivos de tipo salvaje de los cuales derivan. La evidencia adicional del silenciamiento génico en presencia de la construcción de silenciamiento de pVZA100 esta proporcionada por el gen GUS. La reacción del GUS fue siempre positiva en los cultivos que fueron transformados con el pCAMBIA1201 y fueron patogénicos. Mientras que siempre fue negativa en los cultivos que fueron transformados con el pVZA100 y fueron no patogénicos. Esto correlaciona directamente con la actividad de silenciamiento del gen de la cutinasa en el mismo cultivo.

**Ejemplo 15. Secuencias de la cutinasa de <u>Phytophthora altamente homólogas útiles en la presente memoria .</u>**

El análisis de las secuencias génicas de P*hytophthora* proporciona una base para diseñar los polinucleótidos heterólogos que confieren resistencia a la especies cruzadas. Como ilustración del uso del análisis bioinformática para seleccionar las secuencias del gen de patogenicidad de la plaga útiles de acuerdo con la presente invención, se clonaron y secuenciaron 25 muestras diferentes de *Phytophthora*. Las

muestras incluían las nueve especies *P. capsici, P. cinnamomi, P. citricola, P. citrophthora, P. hevea, P. megakarya, P. megasperma* (*P. sojae*), *P. nicotianae* y *P. palmivora*. Cada una de estas secuencias (ver Secuencia ID Nos 13 a 37) son útiles para los polinucleótidos de la presente invención.

Por ejemplo, nueve de las secuencias son idénticas y 11 son > 99% idénticas a la secuencia del gen de la cutinasa de *P. nicotianae*. Una letra [redacted] sombreada indica la diferencia en la secuencia

**Tabla 10. Las secuencias de nucléotidos del gen de la cutinasa de 25 muestras que comprenden 9 especies de Phytophthora.**

| |
|---|
| (VZA 1 65R = Pnic Ri)<br>TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT<br>CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG<br>TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAAT[redacted]TGCTTGCTCTT<br>GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGT[redacted]AG[redacted]TAGATGCACGACATGTTATC[redacted]CCG<br>A[redacted]TATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA<br>GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGT[redacted]<br>GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCAC[redacted]TT[redacted]CC<br>ATTGACGAACGTCACGAACCC[redacted]CTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG<br>CGTAGTCAGCATCGGTGTA **(SEC ID NO: 13)** |
| (VZA 2 69F = Pnic 21)<br>ACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCATCGCG<br>TCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCGTCCTC<br>CACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCTGT<br>GCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGTAT<br>CTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCCAC<br>TGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGCTC<br>TGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGAC<br>GAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAGCGTAGT<br>CAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACG **(SEC ID NO: 14)** |

| |
|---|
| (VZA 3 73F = Pnic 23)<br>TCATACCATCTCGACAATG▮CTC▮AACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTC▮TCAT<br>CGCGTCGGC▮ATCATGTCGTCGGT▮CCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCGT<br>CCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTG▮AACTTGTTCATAAT▮TGCTTGCTCTTG<br>CTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGT▮AG▮TAGATGCACGAC▮TGTTATCGCCGAG<br>TATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTC▮TCACAGAGTCCACGTAGCC<br>ACTGTAGAT▮TCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGT▮<br>CTCTGT▮CGTTGATCTCTTGCTT▮CTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTG<br>ACGAACGTCACGAACCC **(SEC ID NO: 15)** |
| (VZA 4 88F = Pnic 17)<br>TCATACCATC▮CGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT<br>CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG<br>TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT<br>GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG<br>AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA<br>GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT<br>GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC<br>ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG<br>CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGGG **(SEC ID NO: 16)** |
| (VZA 5 62R = Pcap Ri)<br>TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT<br>CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG<br>TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT<br>GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG<br>AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA<br>GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT<br>GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC<br>ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG<br>CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCG **(SEC ID NO: 17)** |

(VZA 6 70F = Pcap 30)
CCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCATCGCGT
CGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGC[redacted]AATCCGTAGCTGCTCGTCCTCC
ACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCTGTG
CTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGTATCT
CCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCCACTG
TAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGCTCTG
TGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGACGA
ACGTCACGAACCCGCTAACACTCT **(SEC ID NO: 18)**

(VZA 7 72F = Pcap 30)
C[redacted]AT[redacted]CGACAATGCCTCGAACT[redacted]G[redacted]CCTTCGGCAACGGCTTCGTCATCGCG
TCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCGTCCTC
CACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCTGT
GCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGTAT
CTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCCAC
TGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGCTC
TGTGCGTTGATCTCCTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGAC
GAACGTCACGAACCCGCTAACACTCT **(SEC ID NO: 19)**

(VZA 8 79F = Pcap 28)
ACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCATCGCG
TCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCGTCCTC
CACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCTGT
GCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGTAT
CTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCCAC
TGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGCTC
TGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGAC
GAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAGCGTAGT
CAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCC **(SEC ID NO: 20)**

(VZA 9 84F = Pcap 01)
T[redacted]ATACCA[redacted]CTCGACAATGC[redacted]TCGAACTTG[redacted]CCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCATCATGTCGTCGGTACCAACATG[redacted]CGAATCCGTAGCTGCTCGTC
CTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGC
TGTGCTTGCCAGGCTTGGCA[redacted]TTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGT
ATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCAC[redacted]TAGCC
ACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTG[redacted]G
CTCTGTGCGTTGA[redacted]C[redacted]CTTGCTTTCTTGATCC[redacted]AC[redacted]AAACCACATTGCCATTG
ACGAACGTCAC[redacted]AACCC[redacted]CTAACACTCTTT[redacted]G[redacted]TCAT[redacted]A[redacted]TCATTAGC[redacted]TA
[redacted]TCA[redacted]CA[redacted]TA[redacted]AC[redacted]TCAGATTCAC[redacted]C[redacted]TCC **(SEC ID NO: 21)**

(VZA 10 87F = Pcap 32)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEC ID NO: 22)**

(VZA 11 89F = Pcap 03)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTCAGATTCACGTCGTT **(SEC ID NO: 23)**

(VZA 12 90F = Pcap 22)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEC ID NO: 24)**

250
250

(VZA 13 91F = Pcap 25)

TCA[redacted]ACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGC[redacted]AATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGGG **(SEC ID NO: 25)**

(VZA 14 81F = Ppal 02)

TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEC ID NO: 26)**

(VZA 15 82F = Ppal 10)

TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCG **(SEC ID NO: 27)**

(VZA 16 83F = Ppal 11)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEC ID NO: 28)**

**(VZA**17 85F = Ppal 04)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEC ID NO: 29)**

(VZA 18 86F = Ppal 05)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGGG **(SEC ID NO: 30)**

252
252

(vza 19 64R = Pcin Ri)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAA[redacted]CCGT[redacted]GCCTCGTC
CTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGC
TGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGT
ATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCC
ACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGC
TCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGATTCGGTCATCAGGGTCA
TTAGCGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACG TCAGATTCACGTCGTTCCCGG
**(SEC ID NO: 31)**

(VZA 20 77F = Pcin 01)
A[redacted]CATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCATCGCG
TCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAA[redacted]CCGTA[redacted]C[redacted]TCGTCCTC
CACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCTGT
GCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGTAT
CTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCCAC
TGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGCTC
TGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGAC
GAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAGCGTAGT
CAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEC ID NO: 32)**

(VXA 21 63R = Pcto Ri)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAA[redacted]CCGT[redacted]GC[redacted]CTCGT
CCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTG
CTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGA
GTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAG
CCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGT
GCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATT
GACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAGCG
TAGTCAGCATCGGTGTAGCACG TCAGATTCACGTCGTTCCCGG **(SEC ID NO: 33)**

253
253

(VZA 22 66R = Pctr Ri)

TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAAC[redacted]TGG[redacted]ATC[redacted]GCG[redacted]TGCTCGTCC
TCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGCT
GTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGT
ATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCC
ACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGC
TCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCCATTGA
CGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAGCGTA
GTCAGCATCGGTGTAGCACG **(SEC ID NO: 34)**

(VZA 23 80F = Pmek 01)

TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGCGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCGG[redacted]AA **(SEC ID NO: 35)**

(VZA 24 92F = Pmeg 01)

CA[redacted]ACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCATC
GCGTCGGCGATCATGTCGTCGGTACCAACATGGC[redacted]AATCC[redacted]TAGCTGCTC[redacted]TC
CTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTTGC
TGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCGAGT
ATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTAGCC
ACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTTGTGC
TCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCC[redacted]TACGAAACCACATTGCCATTGA
CGAACGTCACGAACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCA[redacted]GGTCATTAGCGTA
GTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGTTCCCG **(SEC ID NO: 36)**

(VZA 25 93F = Phev 02)
TCATACCATCTCGACAATGCCTCGAACTTGTCCTTCGGCAACGGCTTCGTCAT
CGCGTCGGCGATCATGTCGTCGGT[redacted]CCAACATG[redacted]CGAATCCGTAGCTGCTCG
TCCTCCACTAGGTGGCGCACCAAGTGGAACTTGTTCATAATATGCTTGCTCTT
GCTGTGCTTGCCAGGCTTGGCAGTTAGATAGATGCACGACATGTTATCGCCG
AGTATCTCCGGAGTCGCAAACTCCCAGCATAGTTCGTCACAGAGTCCACGTA
GCCACTGTAGATCTCTGGTACCTTCATTCATAGCAATATACTCTGCTTCCGTT
GTGCTCTGTGCGTTGATCTCTTGCTTTCTTGATCCGTACGAAACCACATTGCC
ATTGACGAACGTCAC[redacted]AACCCGCTAACACTCTTTCGGTCATCAGGGTCATTAG
CGTAGTCAGCATCGGTGTAGCACGTCAGATTCACGTCGT **(SEC ID NO: 37)**

Sin estar vinculado por la teoría, estas secuencias de la cutinasas proporcionan la base molecular para la resistencia cruzada demostrad anteriormente y avala la aplicación general de la secuenciación del gen y el análisis bioinformático para seleccionar otros genes de patogenicidad de la plagas con resultados similares.

**Ejemplo 16. La resistencia intergenérica del tabaco fue conferida por el silenciamiento del gen de la cutinasa de la P. nicotianae para una enfermedad causada por Peronospora tabacina**

Una forma epidémica natural de la enfermedad del moho azul causada por la P*eronospora tabacina* se produjo en el invernadero que contiene las plantas de tabaco. Se observaron evidencias claras de la gravedad del moho azul. Tres genotipos de las plantas estaban disponibles para la evaluación: plantas transgénicas que contienen el gen de la cutinasa y que ya habían sido seleccionados por la resistencia a *P. nicotianae*, plantas transgénica con cutinasa que no habían sido seleccionados por la resistencia a *P. nicotianae* y plantas de tabaco Xanthi de tipo salvaje o no transgénicas. Los números de las fotografías de la **Figura 5** se refieren a las diferentes clasificaciones de enfermedades, no a a líneas de plantas o genotipos diferentes.

**Tabla 11. Reacciones de diferentes genotipos de tabaco a una forma epidémica natural del moho azul del tabaco causada por *Peronospora tabacina* en el invernadero**

| Genotipo del tabaco | Clasificación y análisis enfermedades | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1* | 2 | 3 | 4 | #Plantas 1+2 | #Plantas 3+4 |
| Resistente a Phytophthora | 34** | 11 | 9 | 12 | 45 (68)*** | 21 (32) |
| Transgénica no seleccionada | 62 | 20 | 67 | 26 | 82 (47) | 93 (53) |
| Tipo salvaje Xanthi | 0 | 3 | 12 | 30 | 3 (7) | 42 (93) |

* = clasificaciones de enfermedades.

** = Número de plantas de esta clase.

*** = Porcentaje de plantas de esta clase

1 = Asintomática
2 = Síntomas evidentes
3 = Síntomas graves
4 = Muerte o moribundo

La Tabla 11 muestra que entre las plantas resistentes a *P. nicotianae*, el 68% de ellas estaban moderadamente afectadas por P*eronospora tabacina* (clasificaciones de enfermedades 1 + 2), y 32 % estaban gravemente afectadas (clasificaciones de enfermedades 3 + 4); aproximadamente una relación 2:1 a favor de la resistencia a P*eronospora tabacina*. Para las plantas transgénicas no seleccionadas, 47% estaban moderadamente afectadas y 53 % gravemente afectadas, aproximadamente una relación 1:1 a favor de la resistencia a P*eronospora tabacina*. De las plantas tipo salvaje, 7% estaban moderadamente afectadas y 93% estaban gravemente afectadas, aproximadamente una relación 13:1 a favor de la susceptibilidad. En consecuencia la **Figura 5** y la Tabla 11 demuestran claramente los diferentes niveles de resistencia de los diferentes genotipos del tabaco y que el gen de la cutinasa de la *P. nicotianae* induce un resistencia amplia en el tabaco a la *Peronospora tabacina,* un hongo poco relacionado con *P. nicotianae*.

La Tabla 12 demuestra que la *Phytophthora nicotianae* y *Peronospora tabacina* no están muy relacionadas taxonómicamente. Aun, como se muestra antes, el gen de la cutinasa de la *Phytophthora nicotianae* confiere resistencia tanto a *Phytophthora nicotianae* como a *Peronospora tabacina.* En consecuencia, el gen de la cutinasa de la *Phytophthora nicotianae* proporciona amplia resistencia contra por lo menos tres

especies fúngicas diferentes y tres enfermedades fúngicas. Este protege contra dos especies diferentes de *Phytophthora, P. nicotianae* en el tabaco y *P. sojae* en la soja, y también protege al tabaco contra ambas *Phytophthora nicotianae* y *Peronospora tabacina*. Estas dos especies fúngicas se clasifican en el mismo orden pero en familias y géneros claramente diferentes (**Tabla 12**).

**Tabla 12. Relación taxonómica entre*Phytophthora nicotianae* y *Peronospora tabacina***

| | *Phytophthora nicotianae* | *Peronospora tabacina* |
|---|---|---|
| Clase | Oomiycetes | Oomycetes |
| Orden | Peronosporales | Peronosporales |
| **Familia** | Pythiaceae | Peronosporaceae |
| **Género** | *Phytophthora* | *Peronospora* |
| **Especie** | *Phytophthora nicotianae* | *Peronospora tabacina* |

**Ejemplo 17. Soja transformada y convertida en resistente con las construcciones de silenciamiento del gen de la Phytophthora**

Cultivo de tejido de soja: Los brotes emergidos de muchos de los embriones de soja transformados con pVZA100 (Ejemplo 7) por *A. tumefaciens* y por biolística (**Figura 6**). Otros callos de la placa continuaron verdes y se convirtieron en muy friables (**Figura 7A**). Se extrajo el ADN de cada una de las muestras de los brotes y callos friables y se realizó la PCR usando los cebadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar el GUS (SEC ID NOs: 9 y 10) y los genes de higromicina fosfotransferasa (SEC ID NOs: 11 y 12)

Tanto los genes del GUS y como los de la higromicina fosfotransferasa genes (HPT) se detectaron en los callos de soja, como se muestra en la **Figura 7B.** El panel superior de la **Figura 7B** muestra que 6 de las muestras (calles 1-6) eran transgénicas para HPT (calle 7 es el plásmido control). El panel inferior muestra que por lo menos 4 (calles 1, 2, 4, 5) de las 6 muestras eran transgénicas para el gen GUS (calle 7 es el

257
257

plásmido control). Estos datos demuestran que las células de la planta hospedante eran transgénicas con el polinucleótido heterólogo del pVZA100 .

El crecimiento continuado de las plántulas y brotes en el medio que contiene 15 mg/l de higromicina demuestran que los callos expresaron el polinucleótido heterólogo .

El hecho de que los callos de soja fueran negativos para el GUS en sus reacciones de tinción demostraron que la expresión del GUS en la célula de la planta hospedante fue silenciada por el polinucleótido heterólogo.

Después, los callos se cultivan, enraizan y trasplantan al suelo y cultivan hasta la madurez para obtener polen y semillas. Las plantas no transformadas se polinizan con polen a partir de una planta transformada madura y la semilla fertilizada resultante se cultiva hasta la planta madura. Las plantas maduras (plantas F0, las plantas cultivadas a partir de las semillas de una planta F0 y las plantas no transformadas regeneradas de las semillas del polen de planta transformado y flores de plantas no transformadas muestran resistencia a *Phytophthora sojae*.

Plantas de soja: Este ejemplo (17) con cultivos de tejido de soja fue claramente demostrado en el Ejemplo 27 donde las plantas de soja transformadas por el bombardeo con el pVZA100 fueron resistentes a *P. sojae* (**Figura 13**). Este resultado también demuestra que la resistencia amplia fue conferida por el gen de la cutinasa de *P. nicotianae* contra *P. sojae*.

**Ejemplo 18 Papas transformadas y convertidas en resistentes a Phytophthora infestans.**

Del Ejemplo 7, se produjeron raíces y minitubérculos en las placas de cultivo (**Figura 8**). Las plántulas, raíces y minitubérculos se cultivaron en un medio que contiene 15 mg/l de higromicina los que demuestra que los callos fueron transformados y que expresan el transgén de la higromicina fosfotransferasa. Los callos de papa transformados con el pCAMBIA1201 presentaron tinción positiva para GUS, mientras que los callos de papa transformados con el pVZA100 presentaron tinción negativa para GUS. Esto demuestra que el GUS fue silenciado en estos tejidos transformados con el pVZA100.

El análisis por PCR demuestra la presencia de los transgenes. La progenie de la planta de las estacas y tubérculos fueron positivas para los ARNsi. Las papas transformadas con la construcción de silenciamiento son resistentes a *Phytophthora infestans*.

Plantas de papa: Este ejemplo (18) con cultivo de tejido de papa fue claramente demostrado en el Ejemplo 27 donde las plantas de papa transformadas por le bombardeo con pVZA300 y pVZA400 fueron resistentes a *P. infestans*.

**Ejemplo 19. La soja se hace resistente a la podredumbre marrón del tallo (ADNr de Phialophora gregata)**

Las células hospedante de soja se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al gen del ARN ribosómico (ADNr) de *Phialophora gregata* (GenBank locus U66728, SEC ID NO: 43). Las plantas de soja se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la podredumbre marrón del tallo después de la inoculación con *Phialophora gregata*. Las plantas resistentes a *Phialophora gregata* son también resistentes a *Phakopsora pachyrhizi* y *Aspergillus nidulans*.

**Ejemplo 20. La soja se hace resistente a la podredumbre marrón del tallo (marcador del ADN del genotipo B de Phialophora gregata)**

Las células hospedante de soja se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al gen del ARN ribosómico (ADNr) de *Phialophora gregata* (GenBank locus U66728, SEC ID NO: 44). Las plantas de soja se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la podredumbre marrón del tallo después de la inoculación. Las plantas resistentes a *Phialophora gregata* son también resistentes a *Phakopsora pachyrhizi* y *Aspergillus nidulans*.

**Ejemplo 21. La soja se hace resistente a la podredumbre de tallo y raíz (cutinasa de Phytophthora sojae)**

Las células hospedantes de soja se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA 100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a la cutinasa de *Phytophthora sojae* (es decir, SEC ID NO: 36). Las plantas de soja se generan de células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la podredumbre de tallo y raíz después de la inoculación con *Phytophthora sojae.*

**Ejemplo 22. La soja se hace resistente a la enfermedasd del moho blanco (subunidad de ARN polimerasa de Sclerotinia sclerotiorum)**

Las células hospedantes de soja se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a al gen rpb2 parcial de *Sclerotinia sclerotiorum* para la segunda subunidad más grande de ARN polimerasa II, exón 1, cepa 484 (GenBank locus AJ745716, SEC ID NO: 45). Las plantas de soja se generan de células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la enfermedad del moho blanco después de la inoculación con *Sclerotinia sclerotiorum.* Las plantas resistentes a *Sclerotinia sclerotiorum* también son resistentes a *Phakopsora*, *Aspergillus nidulans*, *Magnaporthae orizae*, *Candida sojae*, *Gibberella zeae*, y *Puccinia graminis*. Las plantas transformadas muestran crecimiento normal, y carecen de un gen con alta homología con el gen rpb2 de *S. sclerotiorum.* Se obtienen resultados similares mediante las secuencias homosentido y antisentido correspondientes al gen del ARN ribosómico 18S de *Puccinia hordei,* secuencia parcial de GenBank locus AY125412 (SEC ID NO: 46).

**Ejemplo 23. La soja se hace resistente a la enfermedad del moho blanco (transportador de hexosa de Sclerotinia)**

Las células hospedantes de soja se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al gen (*hxt2*) transportador de hexosa de *Sclerotinia sclerotiorum* (GenBank locus AY647268.1, SEC ID NO: 47). Las plantas de soja se regeneran de células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la

enfermedad del moho blanco después de la inoculación con *Sclerotinia sclerotiorum*. Las plantas resistentes a *Sclerotinia sclerotiorum* también demuestran alguna resistencia a *Botrytis cinerea*.

**Ejemplo 24. La soja se hace resistente al síndrome de muerte súbita (cutinasa de Fusarium solani pisi)**

Las células hospedantes de soja se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al ARNm de cutinasa de *F. solani pisi* (GenBank locus K02640.1, SEC ID NO: 48) Las plantas de soja se regeneran de células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al síndrome de muerte súbita después de la inoculación con *Fusarium solani glycines*. Las plantas resistentes a *Fusarium solani glycines* muestran una resistencia algo aumentada a *A. nidulans*.

**Ejemplo 25. La soja se hace resistente a la roya asiática (homólogo de cutinasa de Phakopsora pachyrhizi)**

Las células hospedantes de soja se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al motivo de proteína conservado de *Phakopsora pachyrhizi* de la *Phytophthora nicotianae* y se halla en el genoma de *Phakopsora pachyrhizi* (GenBank locus AC149367.2, SEC ID NO: 49). Sobre la base de la homología con la cutinasa de *Phytophthora nicotianae*, este motiv ode proteína conservado es probablemente un homólogo de cutinasa y participa en al penetración de la cutina de la soja. Las plantas de soja se regeneran de células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la roya asiatica después de la inoculación con *Phakopsora pachyrhizi.*

**Ejemplo 26. La soja se hace resistente a la roya asática (ADNr de Phakopsora pachyrhizi )**

Las células hospedantes de soja se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a una secuencia de ADN ribosómico hallada en el genoma de

*Phakopsora pachyrhizi* (GenBank locus AF333491, SEC ID NO: 50). Las plantas de soja se generan de células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la roya asiática después de la inoculación con *Phakopsora pachyrhizi.*

**Ejemplo 27. Prueba de tabaco, soja, papa y maíz para la transgénesis, resistencia a Phytophthora spp. y resistencia a ácaros**

***Tabaco.***

Las plantas de tabaco maduras producidas en el Ejemplo 5 por la transformación con el pVZA100 se examinaron para determinar la resistencia frente a *P. nicotianae*. Se probaron y tres método de inoculación con *P. nicotianae*. Todos dieron resultados satisfactorios, pero como se explicó anteriormente, el método del palillo fue mas rigurosos y confiable. Generalemtne aproximadamente 20 % de las plantas T0 transformadas con el pVZA100 (generación transgénica inicial) sobrevivió a la infección con *P. nicotianae,* mientras que el 0% de las plantas de tipo salvaje y las plantas transformadas con el pCAMBIA 1201 sobrevivió.

Las plantas sobrevivientes transformadas con el pVZA100 se cultivaron hasta la madurez en la tierra y se recogieron semillas para el posterior análisis. La progenie de las semillas (= generación T1) se cultivó en un medio MS que contiene 30 ug/ml de higromicina y las plantas sobrevivientes se examinaron d nuevo para determinar la resistencia a *P. nicotianae*.

Las plantas sobrevivientes transformadas también se cultivaron hasta la madurez en tierra y se recogieron semillas para el posterior análisis. Un grupo de la progenie de las semillas (= generación T2) de cuatro líneas diferentes (líneas #4, #23, #26 y #27; = diferentes eventos de transformación) de estas plantas se inocularon dos veces sucesivamente para asegurar que cualquiera de los sobrevivientes fueran resistentes a *P. nicotianae*. En la primer inoculación 192 de 442 plantas fueron resistentes (= 43%). Después de la reinoculación: 150 de 192 plantas fueron resistentes (= 78%). En síntesis, 150 de 442 plantas fueron resistentes (= 34%). Todas estas 150 plantas resistentes también se examinaron para determinar la actividad de GUS y se halló que era negativa.

262
262

Las reacciones de las plantas de tabaco se muestran en la Figura 11. la planta A muestra reacciones típicas de las plantas de tabaco tipo salvaje de las transformadas con el pCAMBIA1201. Las plantas son susceptible, se presentan lesiones del tallo mayores, y el sistema de la raíz está esencialmente destruido. Tales plantas usualmente mueren 5-8 días después de la inoculación. La planta B de la línea transgénica 26 (ver a continuación). Esta es típica de las plantas transformadas con el pVZA100. Es altamente resistente a *P. nicotianae* y no mostró síntomas diferentes de lesiones pequeñas en las puntas de las raíces superiores. Tales plantas crecen hasta la madurez y dan semillas fértiles.

***pVZA100 en soja:***

Las plantas de soja se bombardearon con el pVZA100. La PCR con los cebadores apropiados demostró que 15 de las 32 plantas bombardeadas eran transgénicas. Las plantas transgénicas se cultivaron para producir semillas y las plantas de semillas se examinaron para determinar la resistencia *P. sojae*. Como se muestra en la Figura 13, 43 de las 495 plantas de semillas examinadas fueron resistentes a *P. sojae* (Figura 13) mientras que el 100% de un número similar de plantas tipo salvaje y pCAMBIA1201 transformadas (es decir, "control transformado") murieron.

***pVZA100 en papa***

Las plantas de papa se bombardearon con el pVZA100. La PCR con los cebadores apropiados demostró que 15 de las 18 plantas bombardeadas eran transgénicas Las plantas transgénicas se examinan para determinar la resistencia a *P. infestans.* El *100%* de estas plantas son resistentes en comparación con el 0% de resistencia de las plantas tipo salvaje o control transformado.

***pVZA100 en maíz***

Las plantas de maíz se bombardearon con el pVZA100. La PCR con los cebadores apropiados demostró que 33 de las 44 plantas bombardeadas eran transgénicas. Las plantas transgénicas se cultivan para producir semillas y las semillas de planta se examinan para determinar la resistencia a *Pythium graminicola.* El *25%* de

las plantas F1 examinadas son resistente en comparación con 0% de resistencia en las plantas tipo salvaje o control transformado.

Los resultados anteriores demuestran que las plantas útiles de la presente invención incluyen monocotiledóneas y dicotiledóneas.

De forma similar, las plantas de maíz se transforman con el pVZA100 y examinan e ilustran la resistencia cruzada con *Phytophthora* y *Peronospora.*

***pVZA200 en papa***

Las plantas de papa se bombardearon con pVZA200 (catepsina B de *Myzus persicae*). La PCR con los cebadores apropiados demostró que 7 de las 12 plantas bombardeadas eran transgénicas. Las plantas transgénicas se examinan para determinar la resistencia a ácaros (*Myzus persicae).* El 80% de tales plantas, en comparación con el 0% de las plantas control o tipo salvaje son resistentes.

Los ácaros se examinan después de incorporarse a las plantas transformadas. Se determina que el silenciamiento de la catepsina B en ácaros de acuerdo con la presente invención no solo protege la planta (es decir, causa la resistencia a ácaros en las plantas) pero también reduce la población de ácaros.

De acuerdo con la presente invención y este ejemplo, se confiere la resistencia a los insectos a las plantas mediante la transformación con una construcción de silenciamiento que contiene un gen del insecto tal como Catepsina B.

***pVZA300 en papa***

Las plantas de papa se bombardearon con el pVZA300, una construcción que contiene las secuencias homosentido y antisentido homólogos y complementarias a Catepsina B de *Myzus persicae* y INF1 de elicitina de *Phytophthora infestans.* La PCR con los cebadores apropiados demostró que 15 de las 18 plantas bombardeadas eran transgénicas. Tales plantas transgénicas se examinan para determinar la resistencia a ácaros (*Myzus persicae)* y a *Phytophthora infestans.*

En un conjunto de experimentos, un grupo de plantas de papa transformadas se estimulan con solo ácaros y un grupo se estimula con solo *Phytophthora infestans.*

Para las plantas estimuladas con ácaros, el 80% de tales plantas examinadas son resistente en comparación con 0% de resistencia en plantas de tipo salvaje o control transformadas.

Para las plantas estimuladas con *Phytophthora infestans*, el 75% de tales plantas examinadas son resistente en comparación con el 0% de resistencia en plantas no transformadas o control.

En otro juego de experimentos, las plantas de papa transformadas y no transformadas de forma similar se estimulan con ácaros y *Phytophthora infestans* al mismo tiempo. El 60% de las plantas transgénicas examinadas con resistentes a ambas plagas en comparación con el 0% de resistencia de las plantas tipo salvaje o control transformadas.

Después de la incorporación en las plantas transformadas, se aísla y cultiva la *Phytophthora infestans*. Tales cultivos crecen muy lentamente o mueren. El examen microscópico revela que las hifas están gravemente malformadas.

Además, el silenciamiento del ARNr de acuerdo con la presente invención además ilustra una realización por la cual la población del patógeno del suelo se reduce en forma espectacular.

***pVZA300 en soja***

Las plantas de soja se bombardearon con el pVZA300 (una construcción que contiene una secuencia homosentido y antisentido homólogas y complementarias a la catepsina B de *Myzus persicae* y elicitina INF1 de *Phytophthora infestans*). La PCR con los cebadores apropiados demostró que el 60% de las plantas bombardeadas son transgénicas. Las plantas transgénicas se cultivan para producir semillas y las semillas de las plantas se cultivan. Tales plantas F1 se examinan para determinar la resistencia a ácaros (*Myzus persicae)* y a *Phytophthora sojae.*

En un conjunto de experimentos, un grupo de plantas de soja transformadas se estimulan solo con ácaros y un grupo se estimula con *Myzus persicae* solo.

Para las plantas estimuladas con ácaros, el 70% de las plantas F1 examinadas son resistentes en comparación con 0% de resistencia de las plantas tipo salvaje o control transformadas.

Para las plantas estimuladas con *Phytophthora sojae*, 15% de las plantas F1 examinadas son resistentes en comparación con el 0% de resistencia de las plantas tipo salvaje o control transformadas.

En otro conjunto de experimentos, las plantas de sojas transformadas y no transformadas se estimulan con ácaros y *Phytophthora sojae* al mismo tiempo. El 10 % de las plantas F1 examinadas son resistentes a ambas plagas en comparación con el 0% de resistencia de las plantas tipo salvaje o control transformadas .

De acuerdo con la presente invención y estos ejemplos, la resistencia a los insectos y la resistencia a los hongotes conferida a una planta (tanto en especies monocotiledóneas como dicotiledóneas) por un polinucleótido heterólogo único que comprende una pluralidad de genes (es decir, por apilamiento génico). Además, el silenciamiento génico de más de una plaga confiere un sorprendente nivel de resistencia a las plagas a las plantas.

Después de incorporarse a las plantas transformadas, se aísla y cultiva la *Phytophthora sojae*. Tales cultivos crecen muy lentamente o mueren. El examen microscópico revela que las hifas están gravemente malformadas.

***pVZA400 en soja***

Las plantas de soja se bombardearon con pVZA400 que comprenden secuencias antisentido y homosentido homólogas y complementarias con el gen de ARNr de *Phytophthora infestans*. La PCR con los cebadores apropiados demostró que 12 de las 18 plantas bombardeadas eran transgénicas. Las plantas transgénicas se cultivan para producir semillas y las semillas de plantas se examinan para determinar la resistencia a *Phytophthora sojae*. El 15% de las plantas F1 que se examinan son resistentes en comparación con el 0% de resistencia en las plantas no transformadas o transgénicas control.

Después de incorporarse en las plantas transformadas, se aísla y cultiva la *Phytophthora sojae*. Tales cultivos crecen muy lentamente o mueren. El examen microscópico revela que las hifas están gravemente malformadas.

Después, la soja tipo salvaje se estimulan con cultivos de *Phytophthora sojae* derivados de la plantas transformadas con el pVZA400. Tales cultivos de soja *P. sojae* son no patogénicos en comparación con los cultivos de *sojae* que derivan de la soja tipo salvaje o control transformada.

Los resultados anteriores ilustran la utilidad del silenciamiento del ARNr de una plaga (por ej., hongos) y además ilustra la resistencia cruzada con una especie de plaga diferente de la plaga de la cual se construye el gen de patogenicidad de la plaga.

Después de incorporarse en las plantas transformadas, se aísla y cultiva la *Phytophthora sojae*. Tales cultivos crecen muy lentamente o mueren. El examen microscópico revela que las hifas están gravemente malformadas.

Además, el silenciamiento del ARNr de acuerdo con la presente invención además ilustra una realización por la cual la población del patógeno del suelo se reduce en forma espectacular.

***pVZA400 en papa***

Las plantas de papa se bombardearon con el pVZA400 que comprenden secuencias antisentido y homosentido homólogas y complementarias con el gen de ARNr de *Phytophthora infestans*. La PCR con los cebadores apropiados demostró que 6 de las 12 plantas bombardeadas eran transgénicas. Las plantas transgénicas se cultivaron y examinaron para determinar la resistencia a *Phytophthora infestans.* Estas plantas se examinaron y mostraron resistencia en 100% de estas plantas en comparación con el 0% de resistencia de las plantas tipo salvaje o control transformadas.

Después de incorporarse en las plantas transformadas, se aísla y cultiva la *Phytophthora sojae*. Tales cultivos crecen muy lentamente o mueren. El examen microscópico revela que las hifas están gravemente malformadas.

Los resultados anteriores ilustran la utilidad de una única construcción de silenciamiento del ARNr para conferir resistencia a plagas en una pluralidad de plantas a una plaga (por ej., hongos).

**Ejemplo 28. La papa se hace resistente a la podredumbre de tubérculos (factor 1 alfa de elongación de la traducción de Fusarium sambucinum)**

Las células hospedantes de papa se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a la secuencia de ADN del factor 1 alfa de elongación de traducción de *Fusarium sambucinum* (GenBank locus AJ543605, SEC ID NO: 51). Las plantas de papa se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la podredumbre de tubérculo de *Fusarium sambucinum.*

**Ejemplo 29. El tomate se hace resistente al tizón tardío (ge nde elicitina de Phytophthora infestans)**

Las células hospedantes del tomate se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a la secuencia del gen de elicitina hallada en el genoma del *Phytophthora infestans* (GenBank locus AY766228, SEC ID NO: 52). Las plantas de tomate se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al tizón tardío del tomate después de la inoculación con *Phytophthora infestans.*

**Ejemplo 30. La canola se hace resistente a la podredumbre del tallo (subunidad de ARN polimerasa de Sclerotinia sclerotiorum)**

Las células hospedantes de canola se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al gen rpb2 parcial de *Sclerotinia sclerotiorum* para la segunda subunidad más grande de ARN polimerasa II, exón 1, cepa 484 1096 pb (GenBank locus AJ745716, SEC ID NO: 53). Las plantas de canola se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la podredumbre del tallo después de la inoculación con *Sclerotinia sclerotiorum.*

268
768

**Ejemplo 31. El algodón se hace resistente al marchitamiento del algodón (homólogo de cutinasa de Fusarium solani pisi)**

Las células hospedantes de algodón se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al gen de la cutinasa de *F. solani pisi* (GenBank locus K02640.1, SEC ID NO: 48). Esta secuencia se elige en la presente memoria debido a la homología de los genes del género *Fusarium*. Las plantas de algodón se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al marchitamiento del algodón después de la inoculación con *Fusarium oxysporum*.

**Ejemplo 32. El maíz se hace resitente a micotoxinas (cutinasa de F. solani pisi)**

Las células hospedantes del maíz se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al gen de la cutinasa de *F.solani pisi* (GenBank locus K02640.1, SEC ID NO: 48). Esta secuencia se elige en la presente memoria debido a la homología de los genes del género *Fusarium*. Las plantas de maíz se generan de las células transformadas y se seleccionan por la resistencia aumentada a las micotoxinas después de la inoculación con *Fusarium moniliforme*.

**Ejemplo 33. El maíz se hace resistente a la podredumbre del tallo (ADNr de Stenocarpella maydis)**

Las células hospedantes del maíz se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al ARNr de *Stenocarpella maydis* (GenBank locus AY332489, SEC ID NO: 54). Esta secuencia se elige en la presente memoria debido a la homología de los genes de los géneros *Stenocarpella* y *Fusarium*. Las plantas de maíz se generan de las células transformadas y se seleccionan por la resistencia aumentada a la podredumbre del tallo después de la inoculación con *Stenocarpella maydis* y varios *Fusarium spp.*

**Ejemplo 34. El maíz se hace resistente al tizón de la hoja (ADNr 18S de Cercospora zeae-maydis)**

Las células hospedantes del maíz se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al ARN ribosómico 18S de un Cercospora zeae-maydis del Grupo II (GenBank locus AF291710, SEC ID NO: 55). Las plantas de maíz se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al tizón de la hoja después de la inoculación con *Cercospora zeae-maydis.*

**Ejemplo 35. La papa se hace resistente al pulgón del durazno verde (catepsina B proteasa de Myzus persicae)**

Las células hospedantes de papa se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a la Catepsina B proteasa de *Myzus persicae* (GenBank locus AY702822, SEC ID NO: 56). Las plantas de papa se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al pulgón del durazno verde después de la inoculación con *Myzus persicae.*

**Ejemplo 36. La papa se hace resistente al escarabajo de la papa de Colorado (cisteína proteasa de Leptinotarsa decemlineata)**

Las células hospedantes de papa se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a la cisteína proteasa de *Leptinotarsa decemlineata* (GenBank locus AY159377, SEC ID NO: 57*).* Las plantas de papa se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al escarabajo de la papa de Colorado después de la inoculación con *Leptinotarsa decemlineata.* Tales papas regeneradas demuestran la resistencia aumentada a cada una de las siguientes: *Callosobruchus maculates, Diabrotica virgifera virgifera, Acanthoscelides obtectus, Helicoverpa armigera, Leptinotarsa decemlineata, Anthonomus grandis, Triatoma infestans, Tenebrio molitor, Toxoptera citricida, Aphis gossypii, Pandalus borealis, Myzus persicae, Delia radicum, Sarcophaga peregrine, Sitophilus zeamais, Boophilus microplus, Hypera postica, Frankliniella occidentalis,* y *H. americanus.*

270
270

**Ejemplo 37. La papa se hace resistente al marchitamiento del verticilio (ADNr de V. dahliae)**

Las células hospedantes de papa se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al ADNr de *Verticillium dahliae* (GenBank locus AF108478, SEC ID NO: 58). Las plantas de papa se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al marchitamiento del verticilio después de la inoculación con *Verticillium dahliae.*

**Ejemplo 38. La soja se hace resistente al mildiú (ADNr de Peronospora berteroae)**

Las células hospedantes de soja se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a la secuencia parcial del espaciador 1 transcripto interno del ARN ribosómico 5.8S hallado en el genoma de la *Peronospora berteroae* (GenBank locus AY531450, SEC ID NO: 59). Las plantas de soja se generan de células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al mildiú después de la inoculación con *Peronospora manchurica*. Tales sojas seleccionadas también presentan resistencia aumentada a las especies de *Hyaloperonospora* (por ej., *H. camelinae, H. niessleana, H. parasitica* y *H. thlaspeos-perfoliati*) y especie *Peronospora* (por ej., *P. arabidopsidis, P. arabis-alpinae, P. buniadis, P. cardaminopsidis, P. cochleariae, P. dentariae, P. galligena, P. hesperidis, P. iberidis, P. isatidis, P. nesleae, P. sisymbrii-loeselii, P. sisymbrii-officinalis, P. sisymbrii-sophiae, P. thlaspeos-alpestris,* y *P. thlaspeos-arvensis*).

**Ejemplo 39. La papa se hace resistente al nematodo del falso nudo de la papa (citocromo oxidasa II de Meloidogyne chitwoodi)**

Las células hospedantes de papa se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a la secuencia hallada en el genoma de la *Meloidogyne chitwoodi* (es decir, gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa, (GenBank locus AY757882, SEC ID NO:60). Las plantas de papa se generan de las células

transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al falso nudo de la papa después de la inoculación con *Meloidogyne chitwoodi.* También se halló que las plantas de papa seleccionadas son resistentes a *Bombyx mandarina, Bombyx mori, Chilo tumidicostalis, Hemileuca, Hydrotaea aenescens, Meloidogyne hapla, Meloidogyne partityla, Oecetis avara, Papilio aegeus, Papilio demoleus, Papilio erithonioides, Papilio hipponous, Papilio oribazus, Papilio protenor, Papilio troilus, Papilio xuthus, Sabethes cyaneus,* y *Samia cynthia ricini.*

**Ejemplo 40. La soja se hace resistente a la infestación con nematodos (genes de ARN ribosómico de Pratylenchus scribneri y Heterodera glycines)**

La presente invención se puede usar para producir las plantas hospedantes con la resistencia aumentada a nematodos adicionales. Las secuencias de polinucléotidos de nematodos que se conocen y se pueden buscar en bases de datos públicas tales como el NCBI/NIH GenBank demuestran motivos de nucleótidos conservados entre diferentes género de nematodos. Los motivos de nucleótidos fuertemente conservados sugieren que estas secuencias está asociadas con la viabilidad y/o parasitismo y están conservadas desde el punto de vista funcional y se expresan en *Meloidogyne incognita* (nematodo del falso nudo de la papa) y *Globodera rostochiensis* y *Globdera pallids* (nematodos del quiste de papa), y también en los bien estudiados *Heterodera glycines* y *Caenorhabditis elegans.* De este modo, el uso de estas secuencias v y variantes de la misma, es ventajoso porque se puede diseñar tal ARNi para presentar alta especificidad de ARNi y de este modo controlar un gran número de nematodos parasitarios de planta *in planta.* Debido a que los genes identificados en la presente memoria está asociados con supervivencia y/o parasitismo del nematodo, la inhibición del ARNi de estos genes (originados del contacto de los nematodos con composiciones que comprenden a moléculas de ARNi tal como, por ejemplo, por permitir a los nematodos alimentarse de las plantas transformadas como se describe en la presente memoria) impide y/o reduce el crecimiento, desarrollo y/o parasitismo del nematodo parasitario.

La alimentación de nematodos es un indicador útil de la efectividad de los métodos de la presente invención. El ensayo de alimentación *in vitro* de *Pratylenchus scribneri* usa un exudado de raíz de maíz como un estímulo alimentario y a el colorante

272
272

rojo Amaranto, o arsenato de potasio como indicadores de alimentación. La alimentación se confirma después de siete días por la presencia de células intestinales teñidas de rojo en gusanos vivos expuestos al Amaranto o la muerte de los gusanos expuestos al arsenato. El *P. scribneri* se puede cultivar en raíces de maíz tipo salvaje, arroz y *Arabidopsis*, y en raíces pilosas inducidas por *Agrobacterium rhizogenes* de remolacha azucarera y tomate. El *P. scribneri* es muy valioso para evaluar las raíces pilosas transgénicas (idealmente desarrolladas por el uso de cepas de *Agrobacterium rhizogenes* conocidas en el arte como vectores de transformación) debido a la alimentación no específica de estos gusanos.

El maíz, arroz, tomate y remolacha azucarera se transforman con un polinucleótido heterólogo que contiene las secuencias homosentido y antisentido complementarias del ARN ribosómico de *P. scribneri* (GenBank locus SEC ID NO:61). El *P. scribneri* se examina en un ensayo de alimentación que usa maíz, arroz, tomate y remolacha azucarera transformada y de tipo salvaje. Las plantas transformadas demuestran resistencia aumentada al *P. scribneri.*

La soja se transforma con un polinucleótido heterólogo que contiene las secuencias homosentido y antisentido complementarias del ARN ribosómico de *Heterodera glycines* (GenBank locus AY667456, SEC ID NO: 62). *Heterodera glycines* se examina en un ensayo de alimentación que usa soja transformada y de tipo salvaje. La soja transformada demuestra resistencia aumentada a *Heterodera glycines.*

**Ejemplo 41. <u>Diversas plantas se hacen resistentes a la infección por diversas Phytophthora spp. (cutinasa de Phytophthora nicotianae)</u>**

En una realización, el polinucleótido heterólogo del pVZA100 (Ejemplo 3) se usa para transformar una variedad de plantas para conferir resistencia a diversas especies de *Phytophthora*. Por ejemplo, la resistencia se confiere frente a las infecciones de hoja y tallo inducidas por *Phytophthora spp* cuando alguna de *Chrysalidocarpus palm, Catharanthus, Dendrobium*, poinsettia, impatiens, salvia, espatifilio o cebolla se transforma con el pVZA100 (SEC ID NO: 5). Se confiere resistencia contra la podredumbre de raíz inducida por *Phytophthora spp* cuando cualquiera de poinsettia, tomate, ananá o anturio se transforma con el pVZA100.

Se confiere resistencia contra las podredumbres de corona y cuello inducido por *Phytophthora spp spp* cuando cualquiera de sandía, protea, o violeta africana se transforma con el pVZA100.

Se confiere resistencia contra la podredumbre de fruta inducida por *Phytophthora spp* cuando el tomate, papaya o berenjena se transforma con el pVZA100.

**Ejemplo 42. El agave se hace resistente a la podredumbre de raíz del agave (cutinasa de Fusarium solani pisi)**

Las células hospedantes del agave se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al gen de la cutinasa de *Fusarium solani pisi* (GenBank locus K02640.1, SEC ID NO: 48) Esta secuencia se elige en la presente memoria debido a la homología de los genes de los géneros *Fusarium*. Las plantas de agave se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la podredumbre del agave después de la inoculación con el *Fusarium oxysporum*

**Ejemplo 43. El arroz se hace resistente a la piricualriasis (ARN polimerasa II de Magnaporthe grisea)**

Las célula hospedantes de arroz se transforman con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a la un secuencia de ARN polimerasa II de *Magnaporthe grises* (GenBank locus XM 362268, SEC ID NO: 63). La transformación se obtuvo por electroporacion o *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas de arroz se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la piricularíosis del arroz después de la inoculación con *Magnaporthe grisea*.

**Ejemplo 44. Diversas plantas se hacen resistentes la enfermedad de la raíz inducida por Phytophthora (cutinasa de Phytophthora citricola)**

Diversas células de plantas que incluyen a los de *Rhododendron* (por ej. *Rh. catawbiense, Rh. simsii, Rh. Catawbiense), Erica sp., Calluna sp.,* palta, árboles cítricos y lúpulo se transforman con el polinucleótido heterólogo del pVZA100 (Ejemplo 3). Esta

construcción se eligió debido a la homología entre *Phytophthora nicotianae* SEC ID NO: 14 y *Phytophthora citricola* SEC ID NO: 34. Las plantas hospedantes se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la enfermedad después de la inoculación con la *Phytophthora citricola.*

**Ejemplo 45. La cebada se hace resistente a la roya de la hoja de cebada (ARN ribosómica 18S de Puccinia hordei)**

Las células de cebada se transforman con el polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al ARNr 18S de *Puccinia hordei* (GenBank locus AY125412, SEC ID NO:64). Las plantas hospedantes se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la roya de la hoja de la cebada después de la inoculación con *Puccinia hordei.*

**Ejemplo 46. La cebada se hace resistente al mildiú (ADNr de Pseudoperonospora humuli)**

Las células de cebada se transforman con el polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a la secuencias del espaciador 1 transcripto interno de la cepa HV 148 de *Pseudoperonospora humuli*, secuencia parcial; ARN ribosómico 5.8S (GenBank locus AY198305, SEC ID NO: 65). Las planta hospedantes se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al mildiú después de la inoculación con *Pseudoperonospora humuli.*

**Ejemplo 47. La cebada se hace resistente a la enfermedad del moho gris (citocromo P450 monoxigenasa de Botrytis cinerea)**

Las células de cebada se transforman con el polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden a las secuencias de *Botrytis cinerea* para el gen *aba*2 para la citocromo P450 monoxigenasas, exones 1-5 (GenBank locus AJ851088, SEC ID NO: 66). Las plantas hospedantes se generan de las células transformadas y se seleccionan con

éxito para conferir resistencia a la enfermedad del moho gris después de la inoculación con *Botrytis cinerea*.

**Ejemplo 48. El tomate se hace resistente la enfermedad de la peca del tomate (ADNr de Pseudomonas syringae)**

Las células de tomate se transforman con el polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al ARN ribosómico de *Pseudomonas syringae* (GenBank locus AY342210, SEC ID NO: 67). Las plantas hospedantes se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia a la enfermedad de la peca del tomate después de la inoculación con *Pseudomonas syringae*.

**Ejemplo 49. El tomate se hace resistente al marchitamiento bacteriano (gende Cél A de Clavibacter michiganense michiganense)**

Las células de tomate se transforman con el polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al gen de la Cél A de *Clavibacter michiganense michiganense* Cel A (GenBank locus AY007311, SEC ID NO: 68). Las plantas hospedantes se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al marchitamiento bacteriano después de la inoculación con *Clavibacter michiganense michiganense*.

**Ejemplo 50. El maíz se hace resistente al marchitamiento y tizón bacteriano de Goss (gen de endo β-glucosidasa Clavibacter michiganense)**

Las células de maíz se transforman con el polinucleótido heterólogo similar al pVZA100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al gen para endo β-glucosidasa de *Clavibacter michiganense* (GenBank locus X62582, SEC ID NO: 69). Las plantas hospedantes se generan de las células transformadas y se seleccionan con éxito para conferir resistencia al marchitamiento y tizón bacteriano de Goss (pecas y marchitamiento de hojas) después de la inoculación con *Clavibacter michiganense*.

276
276

**Ejemplo 51. Un método para la construcción de silenciamiento para proteger a la soja contra un a o dos enfermedades fúngicas**

Una célula de planta hospedante de soja se transforma con cualquiera de las construcciones de silenciamiento génico de la Figura 10 y las plantas maduras se generan de las mismas. Las plantas maduras se seleccionan por a resistencia a dos enfermedades fúngicas principales, a saber podredumbre de raíz y tallo de soja causada por *Phytophthora sojae* y roya asiática e soja causada por *Phakopsora pachyrhizi.* Se identifican las plantas que son resistentes a cada una y ambas enfermedades. Estas plantas transformadas con la construcción superior son resientes a la podredumbre de raíz y tallo de soja. Estas plantas transformadas con la construcción media son resistentes a la roya asiática. Estas plantas transformadas con la construcción inferior son resistentes a la podredumbre de la raíz y tallo de la soja y roya asiática de la soja.

**Ejemplo 52. Un método de la construcción de silenciamiento para proteger a la soja contra tres enfermedades fúngicas**

Una célula de la planta hospedante de soja se transforma con una construcción de silenciamiento génico policistrónico de la Figura 9 y las plantas maduras se generan de las mismas. Las plantas maduras se seleccionan por la resistencia a tres enfermedades fúngicas principales, a saber podredumbre de raíz y podredumbre de tallo causada por *Phytophthora sojae,* síndrome de muerte súbita causada por *Fusarium solani f. sp. glycines, y* la roya asiática de la soja causada por *Phakopsora pachyrhizi.* Se identifican las plantas que son resistentes a cada una de ellas y a todas estas enfermedades.

**Ejemplo 53. Reducción de la patogénesis de las especies de Phytophthora por incorporación en las plantas transgénicas o por transformación directa con pVZA 100, pVZA300 o pVZA400**

Las células hospedantes de tabaco se transformaron con la construcción de silenciamiento del pVZA 100 (SEC ID NO: 5) y las plantas se generan de las mismas. Tales plantas transformadas fueron altamente resistentes a *P. nicotianae.* Las reacciones típicas para las plantas de tabaco se muestran en la Figura 11. La planta A

muestra reacciones típicas de las plantas de tabaco tipo salvaje o las transformadas con el pCAMBIA1201. Las plantas son susceptibles, aparecen lesiones considerables en el tallo y el sistema de la raíz está esencialmente destruido. Tales plantas usualmente mueren 5-8 días después de la inoculación. La planta B es de la línea transgénica 26 (ver a continuación). Esta es típica de las plantas transformadas con el pVZA100. Es altamente resistente a *P. nicotianae* y no muestra síntomas diferentes que lesiones pequeñas en las puntas de las raíces superior. Tales plantas crecen hasta la madurez y dan semillas fértiles.

Cuando la *P. nicotianae* se re-aisló de las lesiones restringidas de la planta resistente y se re-examinó en las plantas de tipo salvaje, no siempre fue patogénica. El aislamiento del ARN de este hongo y la hibridación con la sonda de cutinasa radiactiva como se describió anteriormente en el Ejemplo 14 indica la presencia de los ARNsi para el gen de la cutinasa en *P. nicotianae*, de este modo se explica la perdía de patogenicidad. En la **Figura 12,** la calle 1 muestra otra vez los 35 nt de los oligonucleótidos VZA 3F (SEC ID NO: 3) y VZA 4R (SEC ID NO: 4) actuando como control del tamaño molecular, la calle 2 muestra el ARN mensajero de 620 nt del hongo de tipo salvaje, la calle 3 muestra los ARNsi de una planta de tabaco transgénica silenciada y la calle 4 muestra los ARNsi del hongo no patogénico aislado del tabaco transgénico resistente.

Como se muestra en el Ejemplo 13, las especies que se transformantes de una plaga directamente con las construcciones de silenciamiento o por alimentación de las especie de plaga con las plantas transformadas con las construcciones de silenciamiento presentaron mayores efectos sobre la patogenicidad, crecimiento y supervivencia de la plaga (en este ejemplo, los hongos). Estos resultados avalan directa o indirectamente la utilidad de esta realización de la presente invención para minimizar las pérdidas de cultivo y mejorar la productividad agrícola.

**Ejemplo 54. <u>Reducción de patogenicidad: sandía transformada con un polinucleótido heterólogo de silenciamiento de cutinasa (cutinasa de F. oxysporum):</u>**

En Florida y Georgia las sandías se pueden plantar en los campos durante solo un año. El agricultor luego debe esperar 6 o 7 años para usar el campo otra vez debido a que un único año de uso causa una alto desarrollo de cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum.* Parea usar el campo en años sucesivos, el agricultor debe recurrir tratamientos anuales costosos y rigurosos con bromuro de metilo u otros potentes productos químicos.

Las sandías se regeneran de una célula de planta hospedante transformada con un polinucleótido heterólogo similar al pVZA 100 (Ejemplo 3) excepto que las secuencias homosentido y antisentido corresponden al gen de la cutinasa en *F. oxysporum. F. oxysporum* infecta la sandía y el gen de la cutinasa de *F. oxysporum* se silencia. Otras especies de sandías (no transformadas de acuerdo con la presente invención) se plantan dentro de los seis pies de la sandía regenerada (transgénica). Tales especie de sandías diferentes se infectan con *F. oxysporum* en una menor medida que la que se pronosticaría si no fuera por le cultivo de las sandías regeneradas (transgénicas) adyacentes a ellas.

**Ejemplo 55. <u>Resistencia amplia de plantas y reducción de patogenicidad con los polinucleótido heterólogo que silencian ARN ribosómico:</u>**

Opcionalmente, para implementar en forma efectiva la reducción de patogenicidad, se puede obteneruna protección amplia o géneros cruzados contra varias especies de hongos patogénicos. Estos se puede lograr por la utilización de construcciones de silenciamiento que contienen genes de ADN ribosómico (ADNr). Las secuencias de ADNr de los patógenos fúngicos son suficientemente similares para actuar en el control de especies fúngicas estrechamente relacionadas, pero son suficientemente distintas para permitir la diferenciación entre los grupos de hongos, de este modo se permite la localización selectiva de grupos específicos de patógenos fúngicos con construcciones de silenciamiento génico únicas o múltiples o policistrónicas.

Este método se ilustra en la Tabla 13. Las secuencias de ADNr 18S de f *Phytophthora sojae* y *Phakopsora pachyrhizi* se "sometieron a una búsqueda blast" frente a los datos del NCBI/NIH GenBank. La secuencia de *Phytophthora sojae* mostró fuerte homología (100 a 93%) con las secuencias de las 16 especies fúngicas estrechamente relacionadas adicionales, pero no mostró homología significativa con la de *Phakopsora pachyrhizi.* A la inversa, la secuencia de ADNre 18S de *Phakopsora pachyrhizi* mostró fuerte homología (100 a 93%) con las secuencias de las 19 especies fúngicas estrechamente relacionadas adicionales, pero no mostró homología significativa con la de *Phytophthora sojae.* En consecuencia, las construcciones de silenciamiento génico individuales se pueden desarrollar de acuerdo con las descripciones de la presente memoria para controlar el grupo de hongos relacionados a *Phytophthora sojae* o a *Phakopsora pachyrhizi,* o alternativamente se puede desarrollar una construcción de silenciamiento génico policistrónica para controlar ambos grupos en forma simultánea.

**Tabla 13. Seceucnia del GenBank de ADN ribosómico que produce alineamientos significativos con las especies blanco**

| | | | |
|---|---|---|---|
| ADN ribosómico 18s de *Phytophthora sojae*<br>Las identidades de las secuencias varían de 100 a 93% sobre 129 nucleótidos. | | ADN ribosómico 18s de *Phakopsora pachyrhizi*<br>Las identidades de las secuencias varían de 100 a 93% sobre 89 nucleótidos . | |
| **Especie de hongo = (17)** | **(bits)** | **Especie de hongo =** | **(bits)** |
| *Phytophthora sojae* | 278 | *Phakopsora pachyrhizi* | 278 |
| *Phytophthora vignae* | 194 | *Phakopsora meibomiae* | 153 |
| *Phytophthora drechsleri* | 174 | *Uromyces aemulus* | 131 |
| *Phytophthora cinnamomi* | 174 | *Puccinia striiformis* | 123 |
| *Plasmopara viticola* | 168 | *Pandora neoaphidis* | 121 |
| *Phytophthora melonis* | 167 | *Puccinia allii* | 119 |
| *Phytophthora cryptogea* | 165 | *Piromyces sp.* | 119 |
| *Phytophthora pistaciae* | 161 | *Dioszegia sp.* | 117 |
| *Hyaloperonospora parasitica* | 161 | *Bullera sp. T* | 117 |
| *Phytophthora niederhauserii* | 161 | *Dioszegia crocea* | 117 |
| *Phytophthora sinensis* | 153 | *Cadophora sp.* | 117 |
| *Phytophthora cajani* | 153 | *Dioszegia hungarica* | 117 |
| *Pythium insidiosum* | 153 | *Phialophora sp.* | 117 |
| *Phytophthora palmivora* | 151 | *Anaeromyces sp.* | 117 |
| *Phytophthora ramorum* | 149 | *Phialophora melinii* | 117 |
| *Peronospora corydalis* | 149 | *Puccinia triticina* | 115 |
| *Pythium rostratum* | 141 | *Neocudoniella radicella* | 115 |
| | | *Pinctada nigra* | 115 |
| | | *Peziza vesiculosa* | 115 |
| | | *Phillipsia domingensis* | 115 |

**Ejemplo 56. <u>Control de múltiples plagas de plantas mediante múltiples polinucleótidos heterólogos de silenciamiento</u>**

Las plantas con frecuencia son atacadaas por una multiplicidad de plagas. Opcionalmente, puede ser útil controlar varias plagas de la misma planta. Los métodos de apilamiento génico para controlar múltiples plagas y las secuencias génicas útiles (por ejemplo, genes que codifican ARN ribosómicos, cutinasas, catepsinas y otras enzimas y proteínas esenciales) se describen en la presente memoria. Un ejemplo no limitante es la soja y el control simultáneo de la podredumbre de raíz y tallo de *Phytophthora*, roya asiática de la soja, el nematodo del quiste de la soja, síndrome de muerte súbita y ácaros. Los ejemplos de genes que se pilan para este propósito incluyen a la SEC ID NO: 14 para la podredumbre de fde raíz y tallo de *Phytophthora*, SEC ID NO: 50 para la roya asiática, SEC ID NO: 62 para el nematodo del quiste de la soja, SEC ID NO: 48 para el síndrome de muerte súbita y SEC ID NO: 56 para los ácaros.

De modo similar, el maíz se puede volver resistente a las podredumbres de de raíz y tallo, micotoxinas, tizones de hojas, barrenadores de tallo y espiga, ácaros y nematodos. De modo similar, el algodón se puede volver resistente a podredumbree cápsula, marchitamiento por *Verticillium* y *Fusarium*, tizones de plántulas, mal e los almácigos, picudos del algodón, gusanos del algodón, ácaros y gusanos. De modo similar, la canola se puede volver resistente a la pata negra, podredumbre del tallo, mancha negra, mal de los almácigos y tizones de las plantulas, pulguillas, picudos y ácaros.

De modo similar, el trigo se puede volver resistente a la roya de hoja y tallo, fusarium de la espiga, manchas de *Septoria*, pietín, carbón, oidios y mildiú, ácaros y nematodos. De modo similar, el tomate se puede volver resistente a ltizón tardío, antracnosis, moho gris, marchitamiento del *Verticillium*, nematodos y ácaros. De modo similar, la papa se puede volver resistente al tizón tardío, tizón temprano, marchitamiento *Verticilliumt*, nematodos, escarabajo de la papa de Colorado y ácaros.

Todas las referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia la presente memoria para todas que describen y para todos los propósitos, en la medida que no incompatibles con las descripciones explícitas de la presente memoria. Se considera que, si bien la invención ha sido descripta en conjunto con la detallada descripción de la misma, la descripción precedente esta destinada a ilustrar y ni limitar el alcance de la invención, que está definida por el alcance de las reivindicaciones anexas. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Los listados de secuencias están incorporados en la presente memoria como referencia.

283
283

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Niblett, Charles L.

<120> Métodos y materiales para conferir resistencia a plagas y patógenos de plantas

<130> VEN-100CXCZ1 PCT

<160> 69

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador VZA 1F

<400> 1
taaattagcg gccgcatgaa attcttcgct cgcagtag 38

<210> 2
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador VZA 2R

<400> 2
aaaaatccat ggtcaagcag aaccacggct tagtg 35

<210> 3
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador VZA 3F

<400> 3
aaataagggc ccatgaaatt cttcgctcgc agt 33

<210> 4
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador VZA 4R

<400> 4
aaatatctcg agtcaagcag aaccacggct tagtg 35

<210> 5
<211> 2201
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> construcción de silenciamiento del pVZA100

<400> 5

gggcccatga aattcttcgc tcgcagtaga tggcactcca gtcgttgccg tgtcgtcacg 60

gctcgcctac gatccgatta accgcagaca caccgattgt gcctgattca gagaggctcc 120

cactgaaacg agatgagcct ggctcacggt cgatgcgcag caccttcata ccatcttcac 180

aatgctcgaa cttgtcttcg gcaacggctt cgtcatcgcg tcggcgatca tgtcgtcggt 240

accaacatgg cgaagccgtt gcctcgtcct ccactaggtg gcgcaccaag tggaacttgt 300

tcataatatg cttgctcttg ctgtgcttgc caggcttggc agttagatac atgcacgaca 360

tgttttcgcc gtgtatctcc ggagtcgcaa actcccagca tagttcgtca cagagtccac 420

gtagccactg tagatctctg gtaccttcat tcatagcaat atactctgct tccgttgtgc 480

tctgtgcgtt gatctcttgc tttcttgatc cgtacgaaac cacattgcca ttgacgaacg 540

tgacgaactg cctaacactc tttcggtcat cagggtcatt gcgtagtgag catcggtgta 600

gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggcaac aattgtccat cactagccgt ggttctgctt 660

gacactaagc cgtggttctg cttgactcga ggtagatctg agggtaaatt tctagttttt 720

ctccttcatt ttcttggtta ggacccttt ctcttttat ttttttgagc tttgatcttt 780

ctttaaactg atctattttt taattgattg gttatggtgt aaatattaca tagctttaac 840

tgataatctg attactttat ttcgtgtgtc tatgatgatg atgatagtta cagaaccgac 900

gactcgtccg tcctgtagaa accccaaccc gtgaaatcaa aaaactcgac ggcctgtggg 960

cattcagtct ggatcgcgaa aactgtggaa ttgatcagcg ttggtgggaa agcgcgttac 1020

aagaaagccg ggcaattgct gtgccaggca gttttaacga tcagttcgcc gatgcagata 1080

ttcgtaatta tgcgggcaac gtctggtatc agcgcgaagt ctttataccg aaaggttggg 1140

caggccagcg tatcgtgctg cgtttcgatg cggtcactca ttacggcaaa gtgtgggtca 1200

ataatcagga agtgatggag catcagggcg gctatacgcc atttgaagcc gatgtcacgc 1260

cgtatgttat tgccgggaaa agtgtacgta tcaccgtttg tgtgaacaac gaactgaact 1320

ggcagactat cccgccggga atggtgatta ccgacgaaaa cggcaagaaa aagcagtctt 1380

acttccatga tttctttaac tatgccggaa tccatcgcag cgtaatgctc tacaccacgc 1440

cgaacacctg ggtggacgat atcaccgtgg tgacgcatgt cgcgcaagac tgtaaccacg 1500

cgtctgttcc atggtcaagc agaaccacgg cttagtgtca agcagaacca cggctagtga 1560

tggacaattg ttgccgggaa cgacgtgaat ctgacgtgct acaccgatgc tcactacgca 1620

atgaccctga tgaccgaaag agtgttaggc agttcgtcac gttcgtcaat ggcaatgtgg 1680

tttcgtacgg atcaagaaag caagagatca acgcacagag cacaacggaa gcagagtata 1740

ttgctatgaa tgaaggtacc agagatctac agtggctacg tggactctgt gacgaactat 1800

gctgggagtt tgcgactccg gagatacacg gcgaaaacat gtcgtgcatg tatctaactg 1860

ccaagcctgg caagcacagc aagagcaagc atattatgaa caagttccac ttggtgcgcc 1920

acctagtgga ggacgaggca acggcttcgc catgttggta ccgacgacat gatcgccgac 1980

gcgatgacga agccgttgcc gaagacaagt tcgagcattg tgaagatggt atgaaggtgc 2040

tgcgcatcga ccgtgagcca ggctcatctc gtttcagtgg gagcctctct gaatcaggca 2100

caatcggtgt gtctgcggtt aatcggatcg taggcgagcc gtgacgacac ggcaacgact 2160

ggagtgccat ctactgcgag cgaagaattt catgcggccg c 2201

<210> 6
<211> 2031
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción de silenciamiento de pVZA200

<400> 6
gggcccacaa gagcgaagat gcagagtacg acaacacata cattccaagg ttctttgacg 60

ctaggagaaa atggagacat tgtagtacga tcggaagagt ccgtgaccaa ggaaactgtg 120

gatcttgttg ggctgtggcc actagctcgg ctttcgctga ccgtttgtgt gtagcaacaa 180

atgcagactt caacgaatta ttatccgccg aagaaatcac tttctgctgt catacatgtg 240

gcttcggatg caacggtggt tacccgatta aagcatggaa acgttttagt aaaaaaggtt 300

tagtcaccgg aggagactac aaatctggag agggttgtga accatacaga gttccacctt 360

gtcctaatga cgaccaagga aataatacat gcgccggtaa accaatggaa tcaaaccaca 420

ggtgtaccag gatgtgctac ggtgaccagg acctcgactt cgacgaagac cacagataca 480

cacgtgatta ctactaccta acatacggta gcatccaaaa ggacgtcatg acttacggac 540

caattgaagc atcgttcgat gtatacgacg atttccccag ttacaagtca ggcgtttacg 600

tgaaatgtag atctgagggt aaatttctag tttttctcct tcattttctt ggttaggacc 660

cttttctctt tttatttttt tgagctttga tctttcttta aactgatcta ttttttaatt 720

gattggttat ggtgtaaata ttacatagct ttaactgata atctgattac tttatttcgt 780

gtgtctatga tgatgatgat agttacagaa ccgacgactc gtccgtcctg tagaaacccc 840

aacccgtgaa atcaaaaaac tcgacggcct gtgggcattc agtctggatc gcgaaaactg 900

tggaattgat cagcgttggt gggaaagcgc gttacaagaa agccgggcaa ttgctgtgcc 960

aggcagtttt aacgatcagt tcgccgatgc agatattcgt aattatgcgg gcaacgtctg 1020

gtatcagcgc gaagtcttta taccgaaagg ttgggcaggc cagcgtatcg tgctgcgttt 1080

cgatgcggtc actcattacg gcaaagtgtg ggtcaataat caggaagtga tggagcatca 1140

gggcggctat acgccatttg aagccgatgt cacgccgtat gttattgccg ggaaaagtgt 1200

acgtatcacc gtttgtgtga acaacgaact gaactggcag actatcccgc cgggaatggt 1260

gattaccgac gaaaacggca agaaaaagca gtcttacttc catgatttct ttaactatgc 1320

cggaatccat cgcagcgtaa tgctctacac cacgccgaac acctgggtgg acctcgagac 1380

cgtggtgacg catgtcgcgc aagactgtaa ccacgcgtct gttatttcac gtaaacgcct 1440

gacttgtaac tggggaaatc gtcgtataca tcgaacgatg cttcaattgg tccgtaagtc 1500

atgacgtcct tttggatgct accgtatgtt aggtagtagt aatcacgtgt gtatctgtgg 1560

tcttcgtcga agtcgaggtc ctggtcaccg tagcacatcc tggtacacct gtggtttgat 1620

tccattggtt taccggcgca tgtattattt ccttggtcgt cattaggaca aggtggaact 1680

ctgtatggtt cacaaccctc tccagatttg tagtctcctc cggtgactaa acctttttta 1740

ctaaaacgtt tccatgcttt aatcgggtaa ccaccgttgc atccgaagcc acatgtatga 1800

cagcagaaag tgatttcttc ggcggataat aattcgttga agtctgcatt tgttgctaca 1860

cacaaacggt cagcgaaagc cgagctagtg gccacagccc aacaagatcc acagtttcct 1920

tggtcacgga ctcttccgat cgtactacaa tgtctccatt ttctcctagc gtcaaagaac 1980

cttggaatgt atgtgttgtc gtactctgca tcttcgctct tgtgcggccg c 2031

<210> 7
<211> 3159
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción de silenciamiento del pVZA300

<400> 7
gggcccgccc tcgtcggctc cacttccgcc accacgtgca ccacctcgca gcagaccgta 60

gcgtacgtgg cgctcgtaag catcctctcg gacacgtcgt ttaatcagtg ctcgacggac 120

tccggctact cgatgctgac ggccacctcg ctgcccacga cggagcagta caagctcatg 180

tgcgcgtcga cggcgtgcaa gacgatgatc aacaagatcg tgtcgctcaa cgctcccgac 240

tgcgagctga cggtgccaac tagtggcctg gtactcaacg tgttcacagc cctcgtcggc 300

tccacttccg ccaccacgtg caccacctcg cagcagaccg tagcgtacgt ggcgctcgta 360

agcatcctct cggacacgtc gtttaatcag tgctcgacgg actccggcta ctcgatgctg 420

acggccacct cgctgcccac gacggagcag tacaagctca tgtgcgcgtc gacggcgtgc 480

aagacgatga tcaacaagat cgtgtcgctc aacgctcccg actgcgagct gacggtgcca 540

actagtggcc tggtactcaa cgtgttcaca acaagagcga agatgcagag tacgacaaca 600

catacattcc aaggttcttt gacgctagga gaaaatggag acattgtagt acgatcggaa 660

gagtccgtga ccaaggaaac tgtggatctt gttgggctgt ggccactagc tcggctttcg 720

ctgaccgttt gtgtgtagca acaaatgcag acttcaacga attattatcc gccgaagaaa 780

tcactttctg ctgtcataca tgtggcttcg gatgcaacgg tggttacccg attaaagcat 840

ggaaacgttt tagtaaaaaa ggtttagtca ccggaggaga ctacaaatct ggagagggtt 900

gtgaaccata cagagttcca ccttgtccta atgacgacca aggaaataat acatgcgccg 960

gtaaaccaat ggaatcaaac cacaggtgta ccaggatgtg ctacggtgac caggacctcg 1020

acttcgacga agaccacaga tacacacgtg attactacta cctaacatac ggtagcatcc 1080

aaaaggacgt catgacttac ggaccaattg aagcatcgtt cgatgtatac gacgatttcc 1140

ccagttacaa gtcaggcgtt tacgtgaaat gtagatctga gggtaaattt ctagtttttc 1200

tccttcattt tcttggttag gacccttttc tcttttttatt tttttgagct ttgatctttc 1260

tttaaactga tctatttttt aattgattgg ttatggtgta aatattacat agctttaact 1320

gataatctga ttactttatt tcgtgtgtct atgatgatga tgatagttac agaaccgacg 1380

actcgtccgt cctgtagaaa ccccaacccg tgaaatcaaa aaactcgacg gcctgtgggc 1440

attcagtctg gatcgcgaaa actgtggaat tgatcagcgt tggtgggaaa gcgcgttaca 1500

agaaagccgg gcaattgctg tgccaggcag ttttaacgat cagttcgccg atgcagatat 1560

tcgtaattat gcgggcaacg tctggtatca gcgcgaagtc tttataccga aaggttgggc 1620

aggccagcgt atcgtgctgc gtttcgatgc ggtcactcat tacggcaaag tgtgggtcaa 1680

taatcaggaa gtgatggagc atcagggcgg ctatacgcca tttgaagccg atgtcacgcc 1740

gtatgttatt gccgggaaaa gtgtacgtat caccgtttgt gtgaacaacg aactgaactg 1800

gcagactatc ccgccgggaa tggtgattac cgacgaaaac ggcaagaaaa agcagtctta 1860

cttccatgat ttctttaact atgccggaat ccatcgcagc gtaatgctct acaccacgcc 1920

gaacacctgg gtggacctcg agaccgtggt gacgcatgtc gcgcaagact gtaaccacgc 1980

gtctgttatt tcacgtaaac gcctgacttg taactgggga aatcgtcgta tacatcgaac 2040

gatgcttcaa ttggtccgta agtcatgacg tccttttgga tgctaccgta tgttaggtag 2100

tagtaatcac gtgtgtatct gtggtcttcg tcgaagtcga ggtcctggtc accgtagcac 2160

atcctggtac acctgtggtt tgattccatt ggtttaccgg cgcatgtatt atttccttgg 2220

tcgtcattag gacaaggtgg aactctgtat ggttcacaac cctctccaga tttgtagtct 2280

cctccggtga ctaaaccttt tttactaaaa cgtttccatg ctttaatcgg gtaaccaccg 2340

ttgcatccga agccacatgt atgacagcag aaagtgattt cttcggcgga taataattcg 2400

ttgaagtctg catttgttgc tacacacaaa cggtcagcga aagccgagct agtggccaca 2460

gcccaacaag atccacagtt tccttggtca cggactcttc cgatcgtact acaatgtctc 2520

cattttctcc tagcgtcaaa gaaccttgga atgtatgtgt tgtcgtactc tgcatcttcg 2580

ctcttgttgt gaacacgttg agtaccaggc cactagttgg caccgtcagc tcgcagtcgg 2640

gagcgttgag cgacacgatc ttgttgatca tcgtcttgca cgccgtcgac gcgcacatga 2700

gcttgtactg ctccgtcgtg ggcagcgagg tggccgtcag catcgagtag ccggagtccg 2760

tcgagcactg attaaacgac gtgtccgaga ggatgcttac gagcgccacg tacgctacgg 2820

tctgctgcga ggtggtgcac gtggtggcgg aagtggagcc gacgagggct gtgaacacgt 2880

tgagtaccag gccactagtt ggcaccgtca gctcgcagtc gggagcgttg agcgacacga 2940

tcttgttgat catcgtcttg cacgccgtcg acgcgcacat gagcttgtac tgctccgtcg 3000

tgggcagcga ggtggccgtc agcatcgagt agccggagtc cgtcgagcac tgattaaacg 3060

acgtgtccga gaggatgctt acgagcgcca cgtacgctac ggtctgctgc gaggtggtgc 3120

acgtggtggc ggaagtggag ccgacgaggg cgcggccgc 3159

<210> 8
<211> 2031
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción de silenciamiento del pVZA400

<400> 8
gggccctttc cgtaggtgaa cctgcggaag gatcattacc acacctaaaa actttccacg 60

tgaaccgttt caacccaata gttgggggtc ttacttggcg gcggctgctg gctttattgc 120

tggcggctac tgctgggcga gccctatcaa aaggcgagcg tttggacttc ggtctgagct 180

agtagctttt ttattttaaa ccctttactt aatactgatt atactgtggg gacgaaagtc 240

tctgctttta actagatagc aactttcagc agtggatgtc taggctcgca catcgatgaa 300

gaacgctgcg aactgcgata cgtaatgcga attgcaggat tcagtgagtc atcgaaattt 360

tgaacgcata ttgcacttcc gggttagtcc tggaagtatg cctgtatcag tgtccgtaca 420

acaaacttgg ctttcttcct tccgtgtagt cggtggagga gatgccagat gtgaagtgtc 480

ttgcggttgg ttttcggacc gactgcgagt ccttttaaat gtactaaact gtacttctct 540

ttgctccaaa agtggtggca ttgctggttg tggacgctgc tattgtagcg agttggcgac 600

cggtttgtag atctgagggt aaatttctag tttttctcct tcattttctt ggttaggacc 660

cttttctctt tttatttttt tgagctttga tctttcttta aactgatcta ttttttaatt 720

gattggttat ggtgtaaata ttacatagct ttaactgata atctgattac tttatttcgt 780

gtgtctatga tgatgatgat agttacagaa ccgacgactc gtccgtcctg tagaaacccc 840

aacccgtgaa atcaaaaaac tcgacggcct gtgggcattc agtctggatc gcgaaaactg 900

tggaattgat cagcgttggt gggaaagcgc gttacaagaa agccgggcaa ttgctgtgcc 960

aggcagtttt aacgatcagt tcgccgatgc agatattcgt aattatgcgg gcaacgtctg 1020

gtatcagcgc gaagtcttta taccgaaagg ttgggcaggc cagcgtatcg tgctgcgttt 1080

cgatgcggtc actcattacg gcaaagtgtg ggtcaataat caggaagtga tggagcatca 1140

gggcggctat acgccatttg aagccgatgt cacgccgtat gttattgccg ggaaaagtgt 1200

acgtatcacc gtttgtgtga acaacgaact gaactggcag actatcccgc cgggaatggt 1260

gattaccgac gaaaacggca agaaaaagca gtcttacttc catgatttct ttaactatgc 1320

cggaatccat cgcagcgtaa tgctctacac cacgccgaac acctgggtgg acctcgagac 1380

cgtggtgacg catgtcgcgc aagactgtaa ccacgcgtct gttaaaccgg tcgccaactc 1440

gctacaatag cagcgtccac aaccagcaat gccaccactt ttggagcaaa gagaagtaca 1500

gtttagtaca tttaaaagga ctcgcagtcg gtccgaaaac caaccgcaag acacttcaca 1560

tctggcatct cctccaccga ctacacggaa ggaagaaagc caagtttgtt gtacggacac 1620

tgatacaggc atacttccag gactaacccg gaagtgcaat atgcgttcaa aatttcgatg 1680

actcactgaa tcctgcaatt cgcattacgt atcgcagttc gcagcgttct tcatcgatgt 1740

gcgagcctag acatccactg ctgaaagttg ctatctagtt aaaagcagag actttcgtcc 1800

ccacagtata atcagtatta agtaaagggt ttaaaataaa aaagctacta gctcagaccg 1860

aagtccaaac gctcgccttt tgatagggct cgcccagcag tagccgccag caataaagcc 1920

agcagccgcc gccaagtaag acccccaact attgggttga aacggttcac gtggaaagtt 1980

tttaggtgtg gtaatgatcc ttccgcaggt tcacctacgg aaagcggccg c 2031

<210> 9
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador primario de GUS

<400> 9
ggtgggaaag cgcgttacaa gaaagc 26

<210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador reverse de GUS

<400> 10
gtttacgcgt tgcttccgcc actgg 25

<210> 11
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Higromicina PT FP

<400> 11
cgtctgtcga gaagtttctg atcga 25

<210> 12
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Higromicina PT RP

<400> 12

290
290

tacttctaca cagccatcgg tccaga 26

<210> 13
<211> 440
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora nicotianae (VZA 1 65R = Pnic Ri)

<400> 13
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatgtgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gtcaggtaga tgcacgacat gttatcaccg aatatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgtcgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acgttaccat tgacgaacgt cacgaaccca ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta 440

<210> 14
<211> 452
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora nicotianae (VZA 2 69F = Pnic 21)

<400> 14
accatctcga caatgcctcg aacttgtcct tcggcaacgg cttcgtcatc gcgtcggcga 60

tcatgtcgtc ggtaccaaca tggcgaatcc gtagctgctc gtcctccact aggtggcgca 120

ccaagtggaa cttgttcata atatgcttgc tcttgctgtg cttgccaggc ttggcagtta 180

gatagatgca cgacatgtta tcgccgagta tctccggagt cgcaaactcc cagcatagtt 240

cgtcacagag tccacgtagc cactgtagat ctctggtacc ttcattcata gcaatatact 300

ctgcttccgt tgtgctctgt gcgttgatct cttgctttct tgatccgtac gaaaccacat 360

tgccattgac gaacgtcacg aacccgctaa cactctttcg gtcatcaggg tcattagcgt 420

agtcagcatc ggtgtagcac gtcagattca cg 452

<210> 15
<211> 388
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora nicotianae (VZA 3 73F = Pnic 23)

<400> 15
tcataccatc tcgacaatgc tcaaacttgt ccttcggcaa cggcttcatc atcgcgtcgg 60

ctatcatgtc gtcggtgcca acatggcgaa tccgtagctg ctcgtcctcc actaggtggc 120

gcaccaagtg aaacttgttc ataatgtgct tgctcttgct gtgcttgcca ggcttggcag 180

tcaggtagat gcacgacttg ttatcgccga gtatctccgg agtcgcaaac tcccagcata 240

gttcttcaca gagtccacgt agccactgta gatatctggt accttcattc atagcaatat 300

actctgcttc cgttgtactc tgtacgttga tctcttgctt ccttgatccg tacgaaacca 360

cattgccatt gacgaacgtc acgaaccc 388

<210> 16
<211> 467
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora nicotianae (VZA 3 73F = Pnic 23)

<400> 16
tcataccatc acgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggg 467

<210> 17
<211> 465
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora nicotianae (VZA 1 65R = Pnic Ri)

<400> 17
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccg 465

<210> 18

<211> 395
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora capsici (VZA 6 70F = Pcap 30)

<400> 18
ccatctcgac aatgcctcga acttgtcctt cggcaacggc ttcgtcatcg cgtcggcgat 60

catgtcgtcg gtaccaacat ggctaatccg tagctgctcg tcctccacta ggtggcgcac 120

caagtggaac ttgttcataa tatgcttgct cttgctgtgc ttgccaggct tggcagttag 180

atagatgcac gacatgttat cgccgagtat ctccggagtc gcaaactccc agcatagttc 240

gtcacagagt ccacgtagcc actgtagatc tctggtacct tcattcatag caatatactc 300

tgcttccgtt gtgctctgtg cgttgatctc ttgctttctt gatccgtacg aaaccacatt 360

gccattgacg aacgtcacga acccgctaac actct 395

<210> 19
<211> 395
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora capsici (VZA 7 72F = Pcap 31)

<400> 19
ctataacgac aatgcctcga actgggcctt cggcaacggc ttcgtcatcg cgtcggcgat 60

catgtcgtcg gtaccaacat ggcgaatccg tagctgctcg tcctccacta ggtggcgcac 120

caagtggaac ttgttcataa tatgcttgct cttgctgtgc ttgccaggct tggcagttag 180

atagatgcac gacatgttat cgccgagtat ctccggagtc gcaaactccc agcatagttc 240

gtcacagagt ccacgtagcc actgtagatc tctggtacct tcattcatag caatatactc 300

tgcttccgtt gtgctctgtg cgttgatctc ctgctttctt gatccgtacg aaaccacatt 360

gccattgacg aacgtcacga acccgctaac actct 395

<210> 20
<211> 395
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora capsici (VZA 8 79F = Pcap 28)

<400> 20
ctataacgac aatgcctcga actgggcctt cggcaacggc ttcgtcatcg cgtcggcgat 60

catgtcgtcg gtaccaacat ggcgaatccg tagctgctcg tcctccacta ggtggcgcac 120

caagtggaac ttgttcataa tatgcttgct cttgctgtgc ttgccaggct tggcagttag 180

atagatgcac gacatgttat cgccgagtat ctccggagtc gcaaactccc agcatagttc 240

gtcacagagt ccacgtagcc actgtagatc tctggtacct tcattcatag caatatactc 300

293
293

tgcttccgtt gtgctctgtg cgttgatctc ctgctttctt gatccgtacg aaaccacatt 360

gccattgacg aacgtcacga acccgctaac actct 395

<210> 21
<211> 461
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora capsici (VZA 9 84F = Pcap 01)

<400> 21
taataccact cgacaatgca tcgaacttga ccttcggcaa cggcttcgtc atcgcgtcgg 60

catcatgtcg tcggtaccaa catgccgaat ccgtagctgc tcgtcctcca ctaggtggcg 120

caccaagtgg aacttgttca taatatgctt gctcttgctg tgcttgccag gcttggcaat 180

tagatagatg cacgacatgt tatcgccgag tatctccgga gtcgcaaact cccagcatag 240

ttcgtcacag agtccacata gccactgtag atctctggta ccttcattca tagcaatata 300

ctctgcttcc gttgcgctct gtgcgttgaa cccttgcttt cttgatcctc actaaaccac 360

attgccattg acgaacgtca ctaaccctct aacactcttt agatcattaa tatcattagc 420

ctaatcaaca aactcctaat acctcagatt cactacaatc c 461

<210> 22
<211> 467
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora capsici (VZA 10 87F = Pcap 32)

<400> 22
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggc 467

<210> 23
<211> 416
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora capsici (VZA 11 89F = Pcap 03)

<400> 23

tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct tcagattcac gtcgtt 416

<210> 24
<211> 466
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora capsici (VZA 12 90F = Pcap 22)

<400> 24
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccgg 466

<210> 25
<211> 467
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora capsici (VZA 13 91F = Pcap 25)

<400> 25
tcaaaccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcaa atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggg 467

<210> 26
<211> 466
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora palmivora (VZA 14 81F = Ppal 02)

<400> 26
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccgg 466

<210> 27
<211> 465
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora palmivora (VZA 15 82F = Ppal 10)

<400> 27
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccg 465

<210> 28
<211> 467
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora palmivora (VZA 16 83F = Ppal 11)

<400> 28
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggc 467

<210> 29
<211> 466
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora palmivora (VZA17 85F = Ppal 04)

<400> 29
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccgg 466

<210> 30
<211> 467
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora palmivora (VZA 18 86F = Ppal 05)

<400> 30
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggg 467

<210> 31

<211> 420
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora cinnamomi (VZA 19 64R = Pcin Ri)

<400> 31
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga agccgttgcc tcgtcctcca ctaggtggcg 120

caccaagtgg aacttgttca taatatgctt gctcttgctg tgcttgccag gcttggcagt 180

tagatagatg cacgacatgt tatcgccgag tatctccgga gtcgcaaact cccagcatag 240

ttcgtcacag agtccacgta gccactgtag atctctggta ccttcattca tagcaatata 300

ctctgcttcc gttgtgctct gtgcgttgat ctcttgcttt cttgatccgt acgattcggt 360

catcagggtc attagcgtag tcagcatcgg tgtagcacgt cagattcacg tcgttcccgg 420

<210> 32
<211> 459
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora cinnamomi (VZA 20 77F = Pcin 01)

<400> 32
atcatctcga caatgcctcg aacttgtcct tcggcaacgg cttcgtcatc gcgtcggcga 60

tcatgtcgtc ggtaccaaca tggcgaagcc gtacctcgtc ctccactagg tggcgcacca 120

agtggaactt gttcataata tgcttgctct tgctgtgctt gccaggcttg gcagttagat 180

agatgcacga catgttatcg ccgagtatct ccggagtcgc aaactcccag catagttcgt 240

cacagagtcc acgtagccac tgtagatctc tggtaccttc attcatagca atatactctg 300

cttccgttgt gctctgtgcg ttgatctctt gctttcttga tccgtacgaa accacattgc 360

cattgacgaa cgtcacgaac ccgctaacac tctttcggtc atcagggtca ttagcgtagt 420

cagcatcggt gtagcacgtc agattcacgt cgttcccgg 459

<210> 33
<211> 442
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora citrophthora (VXA 21 63R = Pcto Ri)

<400> 33
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacgtgggat cggcgttgct cgtcctccac taggtggcgc 120

accaagtgga acttgttcat aatatgcttg ctcttgctgt gcttgccagg cttggcagtt 180

agatagatgc acgacatgtt atcgccgagt atctccggag tcgcaaactc ccagcatagt 240

tcgtcacaga gtccacgtag ccactgtaga tctctggtac cttcattcat agcaatatac 300

tctgcttccg ttgtgctctg tgcgttgatc tcttgctttc ttgatccgta cgaaaccaca 360

ttgccattga cgaacgtcac gaacccgcta acactctttc ggtcatcagg gtcattagcg 420

tagtcagcat cggtgtagca cg 442

<210> 34
<211> 442
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora citricola (VZA 22 66R = Pctr Ri)

<400> 34
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacgtgggat cggcgttgct cgtcctccac taggtggcgc 120

accaagtgga acttgttcat aatatgcttg ctcttgctgt gcttgccagg cttggcagtt 180

agatagatgc acgacatgtt atcgccgagt atctccggag tcgcaaactc ccagcatagt 240

tcgtcacaga gtccacgtag ccactgtaga tctctggtac cttcattcat agcaatatac 300

tctgcttccg ttgtgctctg tgcgttgatc tcttgctttc ttgatccgta cgaaaccaca 360

ttgccattga cgaacgtcac gaacccgcta acactctttc ggtcatcagg gtcattagcg 420

tagtcagcat cggtgtagca cg 442

<210> 35
<211> 469
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora megakarya (VZA 23 80F = Pmek 01)

<400> 35
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtacc aacatggcga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacgaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt tcccggcaa 469

<210> 36
<211> 463
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora megasperma/ P. sojae (VZA 24 92F = Pmeg 01)

<400> 36
cagaccatct cgacaatgcc tcgaacttgt ccttcggcaa cggcttcgtc atcgcgtcgg 60

cgatcatgtc gtcggtacca acatggctaa tcctagctgc tcatcctcca ctaggtggcg 120

caccaagtgg aacttgttca taatatgctt gctcttgctg tgcttgccag gcttggcagt 180

tagatagatg cacgacatgt tatcgccgag tatctccgga gtcgcaaact cccagcatag 240

ttcgtcacag agtccacgta gccactgtag atctctggta ccttcattca tagcaatata 300

ctctgcttcc gttgtgctct gtgcgttgat ctcttgcttt cttgatccct acgaaaccac 360

attgccattg acgaacgtca cgaacccgct aacactcttt cggtcatcaa ggtcattagc 420

gtagtcagca tcggtgtagc acgtcagatt cacgtcgttc ccg 463

<210> 37
<211> 460
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa, Phytophthora heve (VZA 25 93F = Phev 02)

<400> 37
tcataccatc tcgacaatgc ctcgaacttg tccttcggca acggcttcgt catcgcgtcg 60

gcgatcatgt cgtcggtgcc aacatgacga atccgtagct gctcgtcctc cactaggtgg 120

cgcaccaagt ggaacttgtt cataatatgc ttgctcttgc tgtgcttgcc aggcttggca 180

gttagataga tgcacgacat gttatcgccg agtatctccg gagtcgcaaa ctcccagcat 240

agttcgtcac agagtccacg tagccactgt agatctctgg taccttcatt catagcaata 300

tactctgctt ccgttgtgct ctgtgcgttg atctcttgct ttcttgatcc gtacgaaacc 360

acattgccat tgacgaacgt cacaaacccg ctaacactct ttcggtcatc agggtcatta 420

gcgtagtcag catcggtgta gcacgtcaga ttcacgtcgt 460

<210> 38
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Catepsina de M. persicae FP

<400> 38
gggcccacaa gagcgaagat gc 22

<210> 39
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Catepsina de M. persicae RP

<400> 39
atttcacgta aacgcctgac ttgtaactgg 30

<210> 40
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Elicitina de P. infestansFP

<400> 40
gggcccgccc tcgtcggctc c 21

<210> 41
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADNr de P. infestans FP

<400> 41
gggccctttc cgtaggtgaa cc 22

<210> 42
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADNr de P. infestans RP

<400> 42
aaaccggtcg ccaactcgct ac 22

<210> 43
<211> 584
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADNr de Phialophora gregata

<400> 43
tgcggaagga tcattactag agcaaaggat agggagcacc ccacaggagc ttgctccgtg 60

gcgggctgcc cgtcgagcct ctcgaagaag ctcggtcctg aactccaccc ttgaataaat 120

tacctttgtt gctttggcgg gccgcctcgc gccagcggct tcggctgttg cgtgcccgcc 180

agaggaccac aactcttgtt tttagtgatg tctgagtact atataatagt taaaactttc 240

aacaacggat ctcttggttc tggcatcgat gaagaacgca gcgaaatgcg ataagtaatg 300

tgaattgcag aattcagtga atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc ctctggtatt 360

ccgggggggca tgcctgttcg agcgtcatta taaccactca agctctcgct tggtattggg 420

gttcgcggtt ccgcggcccc taaaatcagt ggcggtgcct gtcggctcta cgcgtagtaa 480

tactcctcgc gattgagtct ggcaggtcta catgccagca acacccaaat ttttacaggt 540

tgacctcgga tcaggtaggg ataccccgct gaacttaagc atat 584

<210> 44
<211> 658
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Marcador de ADN delgenotipo B de Phialophora gregata

<400> 44
ctccaccaac taagaacggc catgctggac acgaccactc cggtcatgat cactcccacg 60

accacggaaa gggcaaagct atcgatacca gtgaggacaa gaaggatgag gatgaggatg 120

atggagagga ggttgatgct actggacttg aggacaagga tattgagttg gtcatgaccc 180

aagctagcgt ctcacgaaac aaggctgtca aggcattgaa ggagaacgac aatgatatag 240

tcagctctat tatggctcta agcatataga gagttgacct gttatattcg tctggctgct 300

agactgaact tggctcgttg gaggacgttg tatggagcat gcgtaccctg catctctatc 360

tggggatatg tattctgaaa aagcacttgt ggaacttcaa gtccaaattc tcagaaattt 420

gcacacttgc tacccaatcc tcgtgtatat tgtgactacc ctatacctgt ttgttgtggc 480

ggagatgaag tacctaaaag tttgtgcatt tactctgata tttgatgttc gcgactatgt 540

aggctgccag gaactcccca atagtatgaa tcaagaaatc ggtgcaggga cgtgtaccaa 600

gttagagaac taggtagact ttgaacaatc gctgcatggc cgttcttagt tggtggag 658

<210> 45
<211> 1096
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Subunidad Pol del ARN de Sclerotinia sclerotiorum

<400> 45
ctgttccgca gattaacaac agatgtctac aggtacctgc aacgttgcgt ggaaaacaac 60

agagagttca atttgacgct gggtgtgaaa tccacgacga tcacgaacgg tctgaaatat 120

tctttggcta caggtaactg gggtgaccag aagaaggcag caagttctac cgctggtgtt 180

tctcaagtat tgaacagata taccttcgca tcaacacttt ctcatttgcg ccgaaccaat 240

acgcctatcg gacgtgatgg aaagatcgcc aaacctagac aactgcataa tactcattgg 300

ggtctggttt gtccagcaga gacgccagaa ggtcaagctt gtggtttggt caagaattta 360

gctttgatgt gttacgttac agttggtacg ccaagtgatc caatcgttga gttcatgatt 420

caacgaaata tggaagtgct ggaggagtat gaaccgctcc gagcacccaa tgcaacaaag 480

gtcttcgtca atggtgtttg ggttggtgtc catcgagacc ctgcccattt ggttaaatgt 540

gtacaagatc ttcgtagatc acatttgatt tctcatgaag tctcacttat tcgagaaatt 600

302

302

cgagacagag agttcaagat tttcactgat gcaggacgag tgtgcagacc tctgttggtc 660

atcgacaatg atccagacag ccccaacaaa ggtaatttgg tactgaacaa ggatcacatc 720

cgccgtttgg aggatgatca atctctgcca tcgaacatgg ataaggatga gaaagtacac 780

catggttatt atggattcca aggtttgatt aatgatggtg tggttgaata tttagacgcc 840

gaggaagagg agactgttat gattaccatg acacctgaag atttggatat ttctcgacag 900

cttcaagctg gttatcaaat tcgtcctgat gacagcggtg atttgaataa gcgtgtcaag 960

gcacctatca atccaactgc gcacgtctgg actcattgtg aaattcatcc aagtatgatt 1020

ctgggtatct gtgcaagcat cattcccttc ccggatcata atcaggtaag ctttaagtcc 1080

aataatgaat ttatta 1096

<210> 46
<211> 883
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Gen del ARN ribosómico 18S de Puccinia hordei

<400> 46
agtgaaactg cgaatggctc attaaatcag ttatagttta tttgatgata ccttactaca 60

tggataactg tggtaattct agagctaata catgctgaaa agccccaacc tttggaaggg 120

gtgtatttat tagataaaaa accaatggcc cttgggtctc cttggtgatt cataataact 180

tctcgaatcg catggccttg tgccggtgat gcttcattca aatatctgcc ctatcaactt 240

tcgatggtag gatagaggcc taccatggtg atgacgggta acggggaata agggttcgat 300

tccggagaga gggcctgaga aacggccctc aaatctaagg attgcagcag gcgcgcaaat 360

tacccaatcc tgacacaggg aggtagtgac aataaataac aatgtatggc tcttttgggt 420

cttacaattg gaatgagtac aatttaaatc tcttaacgag gatcaattgg agggcaagtc 480

tggtgccagc agccgcggta attccagctc caatagcgta tattaaaatt gttgacgtta 540

aaaagctcgt agtcgaactt cggcctctgg cagttggtcc gccttttggt gtgtactgat 600

ttgttggagg cttacctctt ggtgaacttc aatgcacttt actgggtgtt gaaaggaacc 660

aggactttta ctttgaaaaa attagagtgg ttcaaagcag cttatgcctg aatacattac 720

catggaataa taaaatagga cgtgtgattc tattttgttg gtttctagga ttaccgtaat 780

gatgaataag gtcagttggg ggcatttgta ttacatcgtc agaggtgaaa ttcttggatt 840

gatgtaagac aaactactgc gaaagcatct gccaaggatg acc 883

<210> 47
<211> 2040
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

303

<223> Transportador de hexosa de Sclerotinia sclerotiorum

<400> 47

ggagactgct gagtctcctg ttattaccga caagaacctc agcagcgctg aaggaactcc 60

agcagcacac acaccagccg atactcctcg tgtcgtcaga tccttaaatg gttctgcacc 120

agagcatcat gatatagtac ccgaggaagc tctcgacaac ttgcctgtca ccaaattagc 180

tattatgctt ggtgctatcg catctatcgg tggtttcatg ttcggttatg aatctggtca 240

aatttctggt ttcgtccaaa tgtccgactt cttagatcga ttcggtgaaa atggtgaact 300

ttctgctgtc cgtcaaggaa ccatcgtcgc cattctctgc gccggtactc ttgttggatg 360

ccttggatct agttacctct gcgatacaat cggtcgtcgt tacactatct ccagttctgc 420

attcttctac atcatcggtg ttatcatcga aatcacttct tctactcact gggttcaatt 480

cgctatgggg agattcactg ctggtgtgaa tgctcccttt aagtttcaat tttagtatct 540

aaactctgta ttataagttg ggtattggtg ctttgagtac tagtgttcct atgtaccaat 600

ctgagtctgt gccaaagaac attcgtggtg ctgtcgtttc cagttatcag ttgttgatta 660

ctcttggtat ctggactgct tatatgatca actacggaac tcattctgcc tataccaaca 720

gtgcacagtg gcggattcct aacggtctct ccgcactctg ggccatcatc ctcggtaccg 780

ctgtcctctt catgcccgaa tccctcgctt tgcataccgt atcggacgtg aagatgaaag 840

ctcgcaaaaa catggctctc ctcaacggtg ttgaccctta ctccccactt atcgattccg 900

agatccaaga aatcgaacaa aagctcgcag ccgaaagaga aggtggtgat caccctggt 960

acgaaatctt tactggccct gttgttccat ttctttcatg atgaattcct tttaaccttg 1020

aacgtgatct catagagaat gttgtaccga acacttctcg gaatggttct tcaagctggt 1080

caacaattga ctggtgccaa tttcttcttc tactatggta ctaccatctt caagtctggt 1140

ggtatctccg attcttatgt tacctctatc attctcggta ccgtcaatgt cgtcgctacc 1200

attggtggtc tctggattgt taagaactgc ggtcgtagga aggctctcat ggttggtgct 1260

gccgagatgt ttgtttgcat gttgatctac tctttcgtcg gacacttcaa gatccaaaga 1320

caagcccaat gctcaagccc ctgggctgtt ttgatttgtt tcacctgtat ctacattgtt 1380

ggatctgcta ctacatgggg acctttggtt tgggccattg tcggagaatt atacccagca 1440

cgttacagag cttcttgcat ggctctcgcc accgcatcga actggctctt caacttcctt 1500

atctctttct tcaccacatt tatcaccaac gatatcgatt actactatgg tcttgtcttt 1560

gccggatccc ttttcgctct cttctggatt gtatacttct tcgttatcga gaccaaggat 1620

cgctcccttg aggaaatcga caccatgtac gtcctccacg tcaacccacg aacatcctcc 1680

acttgggacc ccaagtccct cggtgccgaa ggtgtcaaag gtgttgatac cgatggaatg 1740

ttcttgacca ctggagggaa agatattaag aagagtgaga tggctggacg accaatgttg 1800

gaacatgacg agagaaggtt ccctgagacc gctggaggag ctgcttctca ggagcacaaa 1860

cctgagatta tgaatgctta agcttcgctt catttttgat gagcatggat gaaagaaaaa 1920

304
304

tgcattttac gaatgtatgt cgttactacg agcaaaaagg ggggtgaaat cagtggatga 1980

taaataaacg atggaatata taatgcatgc atataatggc gtttgggaag cagcatcgtc 2040

<210> 48
<211> 883
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cutinasa de Fusarium solani pisi

<400> 48
aaccacacat accttcactt catcaacatt cacttcaact tcttcgcctc ttccttttca 60

ctctttatca tcctcaccat gaaattcttc gctctcacca cacttctcgc cgccacggct 120

tcggctctgc ctacttctaa ccctgcccag gagcttgagg cgcgccagct tggtagaaca 180

actcgcgacg atctgatcaa cggcaatagc gcttcctgcc gcgatgtcat cttcatttat 240

gcccgaggtt caacagagac gggcaacttg ggaactctcg gtcctagcat tgcctccaac 300

cttgagtccg ccttcggcaa ggacggtgtc tggattcagg gcgttggcgg tgcctaccga 360

gccactcttg gagacaatgc tctccctcgc ggaacctcta gcgccgcaat cagggagatg 420

ctcggtctct tccagcaggc caacaccaag tgccctgacg cgactttgat cgccggtggc 480

tacagccagg gtgctgcact tgcagccgcc tccatcgagg acctcgactc ggccattcgt 540

gacaagatcg ccggaactgt tctgttcggc tacaccaaga acctacagaa ccgtggccga 600

atccccaact accctgccga caggaccaag gtcttctgca atacagggga tctcgtttgt 660

actggtagct tgatcgttgc tgcacctcac ttggcttatg gtcctgatgc tcgtggccct 720

gcccctgagt tcctcatcga gaaggttcgg gctgtccgtg gttctgcttg aggaggatga 780

gaattttagc aggcgggcct gttaattatt gcgaggtttc aagtttttct tttggtgaat 840

agccatgata gattggttca acactcaatg tactacaatg cct 883

<210> 49
<211> 595
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Homologo de cutinasa de Phakopsora pachyrhizi
<400> 49
gagattgtgc tgtgcattgc acagcacagc agcaattcca acatcccccc ttgctcacag 60

tcttcaaggc tttgagcaca gattgagaac tttaagagat ttgaggagtg gtgattttcc 120

cagaggtttg gtgaggaagt cagccaacat atcttcactc ttgacatatg ttaaggatat 180

gtgttgtttc tcaatttctt gcttgacaaa atgaagtctg atgtccatat gttttgtctt 240

gaaggttgag tgactagctt gattatttgc aagttctatt gctccttgat tgtcctcaca 300

gatcgtcgtt ggagtatgaa atggcaggtt gaagaagttg gcgatcaagg ttttgatcca 360

305
305

cataacttcc ttggtgacgt cagcaattga cttgtactct gcttctgttg ttgagagaga 420

tattgttggt tgcttttgtg acttccaaga gatgaggttg ccattccata ggaccaagaa 480

tccagatacc gaacgacgag tttgaggaca ggaggcccag tctgcatctg agtaagccaa 540

gagattgttg ccaggaggag actttgtgaa tgtgagacca taggtttttg tatgc 595

<210> 50
<211> 668
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADNr de Phakopsora pachyrhizi

<400> 50
ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaataaaa 60

agctaaagag tgcactttat tgtggctcaa aactaaactt tttaataaac ccatttaatt 120

ggctcattga ttgataagat ctttgggcaa tggtagcttt gaaaaaagct gcaacccacc 180

tattaatcat aatctttttt tttttaactc aaagtcaaat agaatgtttt ataaatttaa 240

atatatatat ataactttta acaatggatc tctaggctct catatcgatg aagaacacag 300

tgaaatgtga taattaatgt gaattgcaga attcagtgaa tcatcaagtt tttgaacgca 360

ccttgcacct tttggtattc caaaaggtac acctgtttga gtgtcatgaa atcttctcaa 420

cattatttct ttttttaaa gggaaattgt tggattttga gtgttgctgt tgcttttttt 480

gcagctcact ttaaataaat aaatatatat aagtttcagt atattttgat gtaataataa 540

aatcatttca tcaaaaaaat aaatatatgt gagatttatt ataacattaa ttgaatgtaa 600

attttttttt aagacctcaa atcaggtgag actacccact gaacttaagc atatcaataa 660

gcggagga 668

<210> 51
<211> 624
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Factor 1 alfa de elongación de traduccion de Fusarium sambucinum
<400> 51
tcgtcgtcat cggccacgtc gactctggca agtcgaccac tgtaagttga cccaaatcta 60

agctcgccta caattggcgg ggtagcctca agatacgctt gtgctgacat acatcataga 120

ccggtcactt gatctaccag tgcggtggta tcgacaagcg aaccatcgag aagttcgaga 180

aggttggtct cattttcctc gatcgcgcgc cctactttcc atcgatccat cattcgaatc 240

gctctgatac gactcgacac acgcctgcta ccccgctcga gttcaaaaat tttacgactt 300

tgtcgtaatt tttttggtgg ggctcatacc ccgccacttg agcgacatgc ccttcctcta 360

aagccacggg cgcgcatcat cacgtgttga tcagttacta acaacctgtc aataggaagc 420

cgccgagctc ggtaagggtt ctttcaagta cgcttgggtt cttgacaagc tcaaagccga 480

gcgtgagcgt ggtatcacca tcgatatcgc tctctggaag ttcgagactc ctcgctacta 540

tgtcaccgtc attggtatgt tgtcactacc acctccatca cattcccgca ctaactcacc 600

tatcagacgc tcccggtcac cgtg 624

<210> 52
<211> 279
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Gen de elicitina de Phytophthora infestans

<400> 52
gccctcgtcg gctccacttc cgccaccacg tgcaccacct cgcagcagac cgtagcgtac 60

gtggcgctcg taagcatcct ctcggacacg tcgtttaatc agtgctcgac ggactccggc 120

tactcgatgc tgacggccac ctcgctgccc acgacggagc agtacaagct catgtgcgcg 180

tcgacggcgt gcaagacgat gatcaacaag atcgtgtcgc tcaacgctcc cgactgcgag 240

ctgacggtgc caactagtgg cctggtactc aacgtgttc 279

<210> 53
<211> 1096
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Subunidad de ARN polimerasa de Sclerotinia sclerotiorum

<400> 53
ctgttccgca gattaacaac agatgtctac aggtacctgc aacgttgcgt ggaaaacaac 60

agagagttca atttgacgct gggtgtgaaa tccacgacga tcacgaacgg tctgaaatat 120

tctttggcta caggtaactg gggtgaccag aagaaggcag caagttctac cgctggtgtt 180

tctcaagtat tgaacagata taccttcgca tcaacacttt ctcatttgcg ccgaaccaat 240

acgcctatcg gacgtgatgg aaagatcgcc aaacctagac aactgcataa tactcattgg 300

ggtctggttt gtccagcaga gacgccagaa ggtcaagctt gtggtttggt caagaattta 360

gctttgatgt gttacgttac agttggtacg ccaagtgatc caatcgttga gttcatgatt 420

caacgaaata tggaagtgct ggaggagtat gaaccgctcc gagcacccaa tgcaacaaag 480

gtcttcgtca atggtgtttg ggttggtgtc catcgagacc ctgcccattt ggttaaatgt 540

gtacaagatc ttcgtagatc acatttgatt tctcatgaag tctcacttat tcgagaaatt 600

cgagacagag agttcaagat tttcactgat gcaggacgag tgtgcagacc tctgttggtc 660

atcgacaatg atccagacag ccccaacaaa ggtaatttgg tactgaacaa ggatcacatc 720

cgccgtttgg aggatgatca atctctgcca tcgaacatgg ataaggatga gaaagtacac 780

catggttatt atggattcca aggtttgatt aatgatggtg tggttgaata tttagacgcc 840

gaggaagagg agactgttat gattaccatg acacctgaag atttggatat ttctcgacag 900

cttcaagctg gttatcaaat tcgtcctgat gacagcggtg atttgaataa gcgtgtcaag 960

gcacctatca atccaactgc gcacgtctgg actcattgtg aaattcatcc aagtatgatt 1020

ctgggtatct gtgcaagcat cattcccttc ccggatcata atcaggtaag ctttaagtcc 1080

aataatgaat ttatta 1096

<210> 54
<211> 538
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ARNr de tenocarpella maydis

<400> 54
gggggacgat tattctttct gaaccctgtg aactacctaa acgttgcttc ggcgggaata 60

gacggccccg tgaaacgggc cgcccccgcc agaggaccct taactctgtt tctataatgt 120

ttcttctgag taaaacaagc aaataaatta aaactttcaa caacggatct cttggctctg 180

gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat 240

catcgaatct ttgaacgcac attgcgcccg ccagtattct ggcgggcatg cctgttcgag 300

cgtcattaca acctcaggcc cccgggcctg gcgttgggga tcggcggagc cccccgtggg 360

cacacgccgt cccccaaata cagtggcggt cccgccgcag cttccatcgc gtagtagcta 420

acacctcgcg actggagagc ggcgcggcca cgccgtaaaa cacccaactc ttctgaagtt 480

gacctcgaat caggtaccaa tacccgctga acttaagcat atcaataagc cgggagga 538

<210> 55
<211> 536
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ARNr 18S de Cercospora zeae-maydis

<400> 55
tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta ccgagtgagg gccttcgggc tcgacctcca 60

acccttttgtg aacacaactc gttgcttcgg gggcgaccct gccgtttcga cggcgagcgc 120

ccccggaggc cttcaaacac tgcatctttg cgtcggagtt taagtaaatt aaacaaaact 180

ttcaacaacg gatctcttgg ttctggcatc gatgaagaac gcagcgaaat gcgataagta 240

atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa cgcacattgc gccctttggt 300

attccgaagg gcatgcctgt tcgagcgtca tttcaccact caagcctagc ttggtattgg 360

gcgccgcggt gttccgcgcg cctcgaagtc tccggctgag ctgtccgtct ccaagcgctg 420

tgatttcatt aatcgcttcg gagcgcgggc ggtcgcggcc gttaaatctt tccaaggttg 480

acctccggat caggtaggga tacccgctga acttaagcat atcaataagc gcagga 536

<210> 56
<211> 1017
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> catepsina B proteasa de Myzus persicae

<400> 56
atggctaggg tattgatgtt attgtctgtg atcttcgtca gcgtttatat gacggaacaa 60

gcatacttct tggaaaaaga tttcattgac aatatcaatg cacaagcgac tacatggaag 120

gctggtgtga acttcgaccc caaaacatca aaggaacata tcatgaaact tttgggatca 180

aggggagtac aaattccaaa caaaaataat atgaatttgt acaagagcga agatgcagag 240

tacgacaaca catacattcc aaggttcttt gacgctagga gaaaatggag acattgtagt 300

acgatcggaa gagtccgtga ccaaggaaac tgtggatctt gttgggctgt ggccactagc 360

tcggctttcg ctgaccgttt gtgtgtagca acaaatgcag acttcaacga attattatcc 420

gccgaagaaa tcactttctg ctgtcataca tgtggcttcg gatgcaacgg tggttacccg 480

attaaagcat ggaaacgttt tagtaaaaaa ggtttagtca ccggaggaga ctacaaatct 540

ggagagggtt gtgaaccata cagagttcca ccttgtccta atgacgacca aggaaataat 600

acatgcgccg gtaaaccaat ggaatcaaac cacaggtgta ccaggatgtg ctacggtgac 660

caggacctcg acttcgacga agaccacaga tacacacgtg attactacta cctaacatac 720

ggtagcatcc aaaaggacgt catgacttac ggaccaattg aagcatcgtt cgatgtatac 780

gacgatttcc ccagttacaa gtcaggcgtt tacgtgaaat cggaaaatgc ttcatacttg 840

ggaggacatg ccgttaaatt gatcggttgg ggtgaagaat acggagtgcc atactggttg 900

atggtcaact catggaacga agattggggt gaccatggtt ttttcaaaat tcaacgaggc 960

acaaacgaat gtggagtcga taattcgaca actgctggtg taccagttac caactaa 1017

<210> 57
<211> 248
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cisteína proteasas de Leptinotarsa decemlineata

<400> 57
attatgggcc cgggggatca aactggaatt cagtgggtgg gattggaata taacatcatt 60

ttcatggatg aagttcttca ttatattctt ttttctctcg ccgcaacaga agctcttagt 120

gataagggag aaatggcaga atttcaaaat caatttctcc aagtcctacc aaaacgtggt 180

agaagaaaaa gggcgtttca atattttcct gtcgaatttg ttgaggatcg aagaacacaa 240

ccaaaatt 248

<210> 58
<211> 519

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADNr de Verticillium dahliae
<400> 58
aggacattac gagtatctac tcataaccct ttgtgaacca tattgttgct tcggcggctc 60

gttctgcgag cccgccggtc catcagtctc tctgtttata ccaacgatac ttctgagtgt 120

tcttagcgaa ctattaaaac ttttaacaac ggatctcttg gctctagcat cgatgaagaa 180

cgcagcgaaa cgcgatatgt agtgtgaatt gcagaattca gtgaatcatc gaatctttga 240

acgcacatgg cgccttccag tatcctggga ggcatgcctg tccgagcgtc gtttcaaccc 300

tcgagcccca gtggcccggt gttggggatc tacgtctgta ggcccttaaa agcagtggcg 360

gacccgcgtg gcccttcctt gcgtagtagt tacagctcgc atcggagtcc cgcaggcgct 420

tgcctctaaa ccccctacaa gcccgcctcg tgcggcaacg gttgacctcg gatcaggtag 480

gaatacccgc tgaacttaag catatcaata agcggagga 519

<210> 59
<211> 762
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADNr de Peronospora manchurica

<400> 59
ctaaaaaaac tttccacgtg aaccgtatca acctttaaa ttggggacaa tgatcttggt 60

ggaggcttct agtcttttgg ctagctgttc actactataa gtgagtccta tcatatcgaa 120

ccattagaca tgaatttgtc atatgaagta gaagaagtta taaaccctta cctaatttac 180

tgattatact gtggggacga aagtctctac ttttattcta gataacaact ttcagcagtg 240

gatgtctagg ctcgcacatc gatgaagaac gctgcgaact gcgatacgta atgcgaattg 300

ctaaattcag tgagtcatcg aaattttgaa cgcatattgc acttctcggg ctagtctcct 360

gaagtatgcc tctatcagtg tccacacaac aaacttggct ttctttttc cgtgtattcg 420

gtgaaggata tgccagatat gaagtgtctt gccctcaatt ttcgaattgg ccgcaagtcc 480

ttttaaatgt aaagactgta cttattgtgc ttgaaaagcg tgacgatact agtttagaaa 540

ctgttcgttt ggccagtcgg cgacgagttt gttaactata actttatgga gaattattcg 600

atttgcggta tgattggctt cggctgaact acgtttattg gattcttttt gtcggttata 660

gaagtatgaa cttgtgaacc gtagctaagc atgtgatgga ttttttttacc tgtgttattg 720

ctgcgaagta aagtgtcaac ttcggttgtc cgataagtcg ac 762

<210> 60
<211> 521
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Citocromo oxidasa II de Meloidogyne chitwoodi

<400> 60
ggtcaatgtt cagaaatttg tggtgttaat cattctttta tgcctattat aattgaggtt 60

gttttatttg attttttaa gataagttta attagctttt tattttatta gaatttttta 120

ttgtgattaa aaaagatttg agctaatata ttatttttg ttgttgaaaa aattaaaaaa 180

aaattataag ttataataat taaaattcta aaaaaggatt atttgttttt tagttaaata 240

ttataaatat aatggtttaa aaaagagaaa ttttgattag aataatatta gttttttttt 300

atatttttta taataattgt ttatttttta taattatttt tttttataaa aataatttaa 360

ttattattat tttatttaaa aaaattaatt aaattaattt ttttgttaaa ttagtttaaa 420

tataaaatgt tttttaaaat ctgatgaatt tttggtttta attttttatt tctgctcagt 480

gatttattga atggtatctt tagcgtgatt ggtcaaaggt a 521

<210> 61
<211> 1773
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADNr de Pratylenchus scribneri

<400> 61
gcttgtctca aagattaagc catgcatgta taagtataaa cgctctgaag cgtgaaaccg 60

cgaacggctc attacaacag ctataattta cttgatcttg attacctact tggataactg 120

tggwaattct agagctaata catgcaccaa agctccaacc cgtaagggaa gagcgcatty 180

attagaacaa aaccatgcgg cttcggccgc tcaatgttga ctcagaataa ctaagctgat 240

cgcatggtct tgtaccggcg acgtgtcttt caagtatctg ccttatcaac tttcgatggt 300

actgtcattg actaccatgg tggtgacggg taacggagga tcagggttcg actccggaga 360

aggggcctga gaaatggcca ctacgtctaa ggatggcagc aggcgcgcaa attacccact 420

ctcagaacaa tttgaggagg tagtgacgag aaataacgag accgttctca acagaggccg 480

gtcatcggaa tgggtacwat ttaaaccctt taacgagtat ctatgagagg gcaagcctgg 540

tgccagcagc cgcggtaatt ccagctctca aaatgcatag aattattgct gcggytaaaa 600

agctcgtagt tggatctgtg ccgacagact ggtccatctt cggatgcgta ctggttattg 660

tcggctttcc tgcagttttg cggctcagtg cctctcacgg ggtgcagtgt ccgttgctgc 720

aagtttactt tgaacaaatc agagtgctct aaacaggcgt ttcgcttgaa tgttcgtgca 780

tggaataata gaagaggatt tcggttctat tttattggtt ttatagactg agataatggt 840

taacagagrc aaacgggggc attcgtattg ctacgtgaga ggtgaaattc ttggaccgta 900

gcaagacgaa ctacagcgaa agcatttgcc aagaatgtct tcattaatca agaaygaaag 960

tcagaggttc gaaggcgatc agataccgcc ctagttctga ccgtaaacga tgccaactag 1020

ckatccgccg gcggaattct tgccctggtg gggagcttcc cggaaacgaa agtcttccgg 1080

ttccgggggа agtatggttg caaagctgaa acttaaagga attgacggaa gggcaccacc 1140

aggagtggag cctgcggctt aatttgactc aacacgggaa aactcacccg gcccggacac 1200

cgtaaggatt gmcagattga tagctttttc atgattcggt ggatggtggt gcatggccgt 1260

tcttagttcg tggagcgatt tgtctggytt attccgataa cgagcgagac tctggcctac 1320

taaatagtcg gcgcattgtc tctgtgtgca tgacttctta gagggatttt cggtgttcag 1380

ccgcacgaaa ttgagcaata acaggtctgt gatgccctta gatgtccggg gctgcacgcg 1440

cgctacactg gcaaaatcag cgtgcttgtc ctcctccgaa aggagttggt aaaccattga 1500

aaatttgccg tgattgggat cggaaattgc aattattttc cgtgaacgag gaaytccaag 1560

taagtgcgag tcatcaactc gcgttgatta cgtccctgcc ctttgtacac accgcccgtc 1620

gctgcccggg actgagccat ttcgagaaac ttggggaccg ctgatttgca gtctttcggg 1680

cctgcttatt ggtgggaacc aatttaatcg cagtggcttg aaccgggcaa aagtcgtaac 1740

aaggtagctg taggtgaacc tgcagctgga tca 1773

<210> 62
<211> 949
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADNr de Heterodera glycines

<400> 62
gtgattccta ttcaccacct acctgctgtc ctgttgggct agcgttggca ccaccaaatg 60

cccccgtccg ctgatgggca caggtcgttc gagatgactt gtggacgctg cccaacatta 120

cggggcagct gcctcacgag ccatgctttt ggggtgcttc catacgttgg agctgtggta 180

taccgctcag tgctgcacat gtgaaagcct gtgtatggct gctgcgtggc aatgtgtcgg 240

tggcgggccg cctcgcttgg ctggttcgct gcgccaatgt gggatgcacg ctcgtggggc 300

gacctaacgg ctgtgctggc gtctgtgcgt cgttgagcgg ttgttgtggc aggcacataa 360

cacactgact ggggatggtg gtttcgttcc cggtcttacg tgccgtaact agcggtgtgt 420

ttgtgcttgc tgctacgtcc gtggccgtga tgagacgacg cggtagggcc cgtgcttggc 480

ctagcacgtg gcttaagact caatgagtgt cagctcgggc accgccagct ttttcttttt 540

tttttcatta ttttttttta cacttctgtt gaagaatgaa ttctagtctt atccggtgga 600

tcactcggct cgtggatcga tgaagaacgc agccaactgc gataattagt gcgaactgca 660

gaaaccttga acacaaaaca ttcgaatgca cattgcgcca ttggagttac atccattggc 720

acgcctggtt cagggtcgtt accataaaat gcactgcttg tgcgttgctt cgtgggatca 780

tgtacttgta cgtgttctta cgttacttgc tcagctcggc tgtggggttt tggtgtgctg 840

gcgcgaactt gtggttctaa ttcgcgtttt acggaccgta actcgggcgc accaatgctt 900

tgcatgctgt ggcggagtgc ctggattact ggcattacct gctttgatt 949

<210> 63
<211> 1120
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ARN polimerasa II de Magnaporthe grisea
<400> 63
atgaagcctg aggacctaaa gaaaatggac attgccacaa aagacacaga cgcacggcga 60

cctggtcacc ttcgagccct taaccgtagc agcgacaccg atttcaccga ctcccgccta 120

aaaccagaac cgcttcgtct aggtcgcagg gatgtttctg gtgcagaatc gactcacatg 180

tctctcgacg acagtctgat gtcaccagat ccaggggcat tggcaggtga tgaagactca 240

gatctgggaa aatgcgagcg caactgggag gcggagagct taggatcgcc cgtcagcaac 300

ggtatacata gcccatcaca catgggtgag caagcacctc ccttttcgga ctacaaccct 360

tctgaatctc ctccagaagc aatcgtacat cgagagcaag gtgattctgc ccagatggac 420

gcgaaatcct cgtcgcaatc gcggcactct gtctatgcta acttggtagt tcctgagtcc 480

aaaccactaa cccgacaatc cagcctggct cagctccgac agcctattga ggcaaaggca 540

gaagctcgtt ccaggccagc gtccattcta atagttccta cacaggggag tgctacgccc 600

tcgataaata ctcctatatt tgagaaaaga ttggcaacca gaagcccaga gactccgtca 660

attgtacagc cagcaaatat ttcgacgccc agttccatgg ttcataagaa ggagtctgca 720

ggaacccata gtcgaccagc tatacaatcc tctttctccg attcacccaa tgcagcttgg 780

cctggtaatt tgctttcagc caggggtcta gattacaaac tacgatcaag actgtccgag 840

ccagctcttg taagaagcgg ccagaaaaaa ccgtctagtg ttggcgggca tcctggatat 900

accactcccg taccggttac accccaaagg cctgtgacaa agtcttcggt cttacactca 960

agcccggtcc accacctaat gcgctctgca aataccgtgt cttctcgaca ttccattgcg 1020

acaacagata ggcatgctac aaccggtggc gcatctcaga gtgggggtac gagccacaag 1080

ctgggagctc agtcgtgtcc gaaccgagtt gcagagcttc 1120

<210> 64
<211> 883
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADNr 18S de Puccinia hordei

<400> 64
agtgaaactg cgaatggctc attaaatcag ttatagttta tttgatgata ccttactaca 60

tggataactg tggtaattct agagctaata catgctgaaa agccccaacc tttggaaggg 120

gtgtatttat tagataaaaa accaatggcc cttgggtctc cttggtgatt cataataact 180

tctcgaatcg catggccttg tgccggtgat gcttcattca aatatctgcc ctatcaactt 240

tcgatggtag gatagaggcc taccatggtg atgacgggta acggggaata agggttcgat 300

tccggagaga gggcctgaga aacggccctc aaatctaagg attgcagcag gcgcgcaaat 360

tacccaatcc tgacacaggg aggtagtgac aataaataac aatgtatggc tcttttgggt 420

cttacaattg gaatgagtac aatttaaatc tcttaacgag gatcaattgg agggcaagtc 480

tggtgccagc agccgcggta attccagctc caatagcgta tattaaaatt gttgacgtta 540

aaaagctcgt agtcgaactt cggcctctgg cagttggtcc gccttttggt gtgtactgat 600

ttgttggagg cttacctctt ggtgaacttc aatgcacttt actgggtgtt gaaaggaacc 660

aggactttta ctttgaaaaa attagagtgg ttcaaagcag cttatgcctg aatacattac 720

catggaataa taaaatagga cgtgtgattc tattttgttg gtttctagga ttaccgtaat 780

gatgaataag gtcagttggg ggcatttgta ttacatcgtc agaggtgaaa ttcttggatt 840

gatgtaagac aaactactgc gaaagcatct gccaaggatg acc 883

<210> 65
<211> 802
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADNr de Pseudoperonospora humuli

<400> 65
ccacacctaa aaactttcca cgtgaactgt ttcaacctca ttaattgggg gttttgtttg 60

gcggtgatcg ctagcttaat tgctggttga ttactgctag gcgagcccta tcatggcgag 120

cgtttgggct tcggtctgaa ctagtagctt ttattttaaa ccctttctta attactgatt 180

atactgtggg gacgaaagtc tctgctttta actagatagc aactttcagc agtggatgtc 240

taggctcgca catcgatgaa gaacgctgcg aactgcgata cgtaatgcga attgcaggat 300

tcagtgagtc atcgaaattt tgaacgcata ttgcacttcc gggttagtcc tgggagtatg 360

cctgtatcag tgtccgtaca tcaaacttgg ttttcttctt tccgtgtagt cggtggagga 420

tatgccagat gtgaagtgtc ttgcggctaa ttttagaatt gactgcgagt cctttgaaat 480

gtacagaact gtacttctct ttgctcgaaa agtgtggcgt tgctggttgt gaaggctgtc 540

catgtgacca gtcggcgatc ggtttgtctg ctatggcatt aatggaggaa tatttaattc 600

gcggtatgat tagcttcggc tgaacaggcg cttattgaac gtttttcctg ttgtggcggt 660

atgaactgat gaaccgtagt cgtgtgtgac ttggcttttg aattggcttt gctattgcga 720

agtagagtgg cagtttcgac tgtcgagggt cgacccattt gggaactatg tgttgtgtgg 780

cttcggtcgc gcggcatctc aa 802

<210> 66
<211> 1260
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Citocromo P450 monooxigenasa de Botrytis cinerea

<400> 66
ctttattcga tattaatagt attatatgtt atacagagac tataaagaaa atatatgttt 60

tccttttaa tattagattt ttacttttt ataataatga tttattttta ttattatatt 120

agtctcttta atattgaaat aatatttatt agaaacaata taagaaatag ctaacttgaa 180

attaaaaagt ataaaatcta acaaatctat agaatagaat cttgtaaact ttattaaact 240

tgaaagatat ttaaatatat atttaagatc tcctaaacct cctcttttta aatcagtcag 300

tagatctcct atattctaaa aattaagaaa gttagcatgt gaattaatat ttaggcaggt 360

gttccacacg atatctagaa aaggagcttc tagaccctcc cgtctagacc ctcccgttta 420

gacccccccg tctagaccta ccctccggca aaccttcggg tatttaccga atcaaaaagg 480

ctaggatgtg gggctgagta aactctagat tgtgaccccc actatgggtc tgacagccct 540

agaaacaact taatctgttt ggatattgcg gggtttcact gcggagtctt gtatgtagat 600

cgaaagtcgc caagcccatg aaacatttca aggtgtaaag tatgttacgg atttaagttt 660

gcttccagcc caatcgtaag ccttatctct gacgttgaac tgaagtttag agtttcctgt 720

aagcatatac acttgaaagt acatcctcct caatctgcgg tgattatgcg ttttttttc 780

gcaactcttg taatacgaac acaactactc acaatcactc ttatgaaatt tacttgtccc 840

aaaaggacat catgctgctt agcattaaag acctgtctga aaaatacatc atgctgctcg 900

atgtcaaaga tctgtcgaca ctcaaaacaa ctgttgccgt tctagtgagt ccattattca 960

taccagaggg agggtaattc cttaacatga ccaggtcacg gtagccctta ttgcacaagt 1020

cctttggaaa attttctttc acccgctcag tgcctttcca gggccgtggt tcaacaggat 1080

atccgaaata cccggctcgt gggttattgc aactgggaag cagcactcat attaccggaa 1140

gcttcatgaa aaatatggtg agtaactatt cctgtacctt gctccttctt tcgggaaaca 1200

agttcatact aaaacaaatt caggcccagt tgtgagagtt gccccaaatg agctcagctt 1260

<210> 67
<211> 536
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADNr de Pseudomonas syringae
<400> 67
atcgacgact cagctgcacc ataagcaccc acacgaattg cttgattcat tgaagaagac 60

gatgagaagc agcttttgct ttgcacaccc gattttgggt ctgtagctca gttggttaga 120

gcgcacccct gataagggtg aggtcggcag ttcgaatctg cccagaccca ccagttacct 180

ggtgaagttg gtcagagcgc gtacgacacc cggatacggg gccatagctc agctgggaga 240

gcgcctgcct tgcacgcagg aggtcagcgg ttcgatcccg cttggctcca ccacttactg 300

315
315

cttctgtttg aaagcttaga aatgagcatt ccaccctgag agattgaagg gtgcgtgaat 360

gttgatttct agtctttgat tagatcgttc tttaaaaatt tgggtatgtg atagaaagaa 420

atatagaccg ggcacctctt tcactggtgc gtgtccgggc taaggtaaag tttgtgaaat 480

gcaaactttc ggcgaatgtc gtcttcacag tataaccaga ttgcttgggg ttatat 536

<210> 68
<211> 983
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Gen de la cél A de Clavibacter michiganense michiganense

<400> 68
atgactgttc gacaagttag tgtaccctta gtgtccaagc tcttcctttt ctttgcattg 60

gcggtcggcg ccacgtttgg cgcattcgcg gcgcctgcct tagccgccac cgcagcgggg 120

accggtgcgg tggcctcgcc gcctggatgg ctgcacacgg cgggtgggaa gatcgtcacc 180

gcctccggcg ctccgtacac aatccgtggc atcgcgtggt ttggcatgga gacgtcatcc 240

tgcgcgccgc acggcctgga caccatcacc ctcgcgggtg gcatgcagca catcaagcag 300

ctgggattca cgaccgtgcg gctgccgttc tcgaaccagt gcctcgcggc atctggcgtc 360

acgggtgtcg atgcggaccc atcgcttgcc ggtctcacac cgctgcaggt catggatcac 420

gtcgtggctt cggcgaaggc cgccggactt gacgtgatcc tcgaccagca ccggccggac 480

tcgggcggcc agtccgagct ctggtacacc tcggagtacc ccgagtcacg gtggatctcc 540

gactggcgga tgctcgcgaa gcggtacgcc tccgacccca cggtcatcgg tgtcgatctc 600

cacaacgagc cgcacggggc ggcgacgtgg ggtaccgggg cagccacgac cgactggcgg 660

gcggcggccg agcggggcgg gaacgcggta ttggccgaga acccgaagct cctcgtgctc 720

gtcgagggaa tcgaccacca ggccgacgga accggcacct ggtggggcgg tgcgctggac 780

tccgcggcca ctgcatccgt gcgcttgacc gtcgcgaatc gcgtcgtcta ttccccgcac 840

gactacccct cgaccatcta cggccagccc tggttctccg catcgaatta tccgacgaat 900

cttccgggaa tctgggacgc ccactgggga tacctggcaa agaaggacat cgcccccgtc 960

ctcgtgggcg agttcggtac gaa 983

<210> 69
<211> 1260
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Gen de la endo b-glucosidasa de Clavibacter michiganense

<400> 69
ctcagggaac taaccggatg agcactgttt cgggcgtgag gagtgcgtgc gaaaggcgtc 60

tgtggaagtg gttttcagtg cggccggatg gcttccctac gatccttata tgacatttcg 120

ccaagttcgt gcatccttag tgcttcggct cgtccttctc cttgcgttgg tggtcggcac 180

cacgtccgcc gcattcgctg cgcctgtctc agccgccacc gtagcggggc ccgttgcggc 240

ggcctcatcg cctggatggc tgcatacggc gggcgggaag atcgtcaccg cctccggtgc 300

tccgtacacg atccgtggca tcgcttggtt tggcatggag acgtcgtcgt gcgcgccgca 360

tggcctggac accatcaccc tcgcgggcgg tatgcagcac atcaagcaga tggggttcac 420

gaccgtgcgg ttgcccttct cgaaccagtg cctcgccgcg tccggcgtca cgggtgtcag 480

tgcggacccg tcactcgccg ggctcacgcc gctgcaggtc atggaccacg tcgtcgcgtc 540

ggcgaagagc gccggtcttg acgtgatcct cgaccagcac cggccggact cgggcggcca 600

gtctgagctc tggtacacat cgcagtatcc ggagtcgcgg tggatctccg actggaggat 660

gctcgcaaag cgctatgcag ccgaacccac cgtcatcggt gtagacctcc acaacgaacc 720

gcacggtgcg gcgacctggg gtaccggggc ggccaccact gactggcggg cagcggccga 780

gcgtggcggg aatgcggtcc tcgccgagaa cccgaacctc ctcgtgctcg tggagggcat 840

cgaccacgag gccgacggat ctggcacctg gtggggcggc gcgctcgggt tggtaggcaa 900

tgcacctgtg cggctgtcgg tcgcgaatcg cgtcgtctac tccccgcatg actacccctc 960

gaccatttac ggccagtcat ggttctccgc atcaaactat ccggcgaact tgccgggtat 1020

ttgggacgcc cactggggat acctggcgaa gaaggacatt gccccggttc tcgtgggtga 1080

gttcggtacg aagttcgaga cgacgagcga caagcagtgg ctcaacaccc tcgttggata 1140

tctgtcgagc acggggatca gctcgtcgtt ctgggccttc aacccgaata gtggcgacac 1200

cggcggtatc gtgaagtccg actgggtgac cccggagcag gcgaagctcg acgccctggc 1260

317
317

## REIVINDICACIONES

1. Un método para conferir resistencia a plagas a una planta que comprende un paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido que comprende:

(a) una primera secuencia antisentido que presenta homología con un primer gen de patogenicidad de la plaga;

(b) una segunda secuencia antisentido que presenta homología con un segundo gen de patogenicidad de la plaga;

(c) una primera secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha primera secuencia antisentido; y

(d) una segunda secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha segunda secuencia antisentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra que comprende nucleótidos codificados por la primera secuencia antisentido y la primera secuencia homosentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra que comprende nucleótidos codificados por la segunda secuencia antisentido y la segunda secuencia homosentido y

donde cada una de dichas primera y segunda secuencias homosentido y primera y segunda secuencias antisentido tienen aproximadamente 19 nucleótidos de longitud.

2. El método de la reivindicación 1 donde dicha planta es resistente a por lo menos una plaga seleccionada del grupo que consiste en un insecto, una bacteria, un hongo y un nematodo en comparación con una planta sustancialmente igual que carece del polinucleótido heterólogo.

3. El método de la reivindicación 1 donde dicha planta es resistente a por lo menos dos plagas, donde cada una de dichas dos plagas pertenece a un miembro diferente seleccionado del grupo que consiste en un insecto, una bacteria, un hongo y un nematodo.

4. El método de la reivindicación 1 donde dicha planta es resistente a por lo menos dos plagas, donde cada una de dichas dos plagas pertenece a diferentes

subespecies del mismo miembro seleccionado del grupo que consiste en un insecto, una bacteria, un hongo y un nematodo.

5. El método de la reivindicación 1 donde dicha planta es resistente a por lo menos dos plagas, donde cada una de dichas por lo menos dos plagas pertenece a diferentes especies del mimo miembro seleccionado del grupo que consiste en un insecto, una bacteria, un hongo y un nematodo.

6. El método de la reivindicación 1 donde dicha planta es resistente a por lo menos dos plagas, donde cada una de dichas por lo menos dos plagas pertenece a diferentes géneros del mismo miembro seleccionado del grupo que consiste en un insecto, una bacteria, un hongo y un nematodo.

7. El método de la reivindicación 1 donde dicha planta es resistente a por lo menos dos plagas, donde cada una de dichas por lo menos dos plagas pertenece a diferentes familias del mismo miembro seleccionado del grupo que consiste en un insecto, una bacteria, un hongo y un nematodo.

8. El método de la reivindicación 1 donde dicha planta es resistente a por lo menos dos plagas, donde cada una de dichas por lo menos dos plagas pertenece a diferentes órdenes del mismo miembro seleccionado del grupo que consiste en un insecto, una bacteria, un hongo y un nematodo.

9. Un método para conferir resistencia a plagas a una planta que comprende el paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido que comprende:

(a) una secuencia antisentido que presenta homología con un primer gen de patogenicidad de la plaga;

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido;

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra que comprende nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido ;

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene aproximadamente 19 nucleótidos de longitud; y

donde la secuencia antisentido es homóloga al gen de patogenicidad de por lo menos dos plagas de especies diferentes, por lo cual la planta es resistente a dichas dos plagas en comparación con la planta sustancialmente igual que carece del polinucleótido heterólogo.

10. El método de la reivindicación 9 donde dichas por lo menos dos plagas se seleccionan del grupo que consiste en insectos, bacterias, hongos y nematodos.

11. El método de la reivindicación 9 donde dichas por lo menos dos plagas son de dos subspecies diferentes.

12 El método de la reivindicación 9 donde dichas por lo menos dos plagas son de dos especies diferentes.

13. El método de la reivindicación 9 donde dichas por lo menos dos plagas son de dos géneros diferentes.

14. El método de la reivindicación 9 donde dichas por lo menos dos plagas son de dos familias diferentes.

15. El método de la reivindicación 9 donde dichas por lo menos dos plagas son de dos órdenes diferentes.

16. Un método para conferir resistencia a una planta que comprende un paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) un primer promotor operativamente unido a una secuencia antisentido donde dicha secuencia antisentido es homóloga a un gen de patogenicidad de plaga y está operativamente unida a un terminador;

(b) un segundo promotor operativamente unido a una secuencia homosentido donde dicha secuencia homosentido es sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido y operativamente unida a un terminador,

donde dicho promotor es un promotor potente en relación con el primer promotor,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra entre las secuencias codificadas por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido y

donde dicha primera y segunda secuencias homosentido y primera y segunda secuencias antisentido tienen por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud.

17. Un método para conferir resistencia a una planta que comprende un paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido homóloga a un gen de patogenicidad de la plaga;

(b) una primera secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido y

(c) una segunda secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido y

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra entre las secuencias codificadas por la secuencia antisentido y la primera secuencia homosentido,

donde dicha primera y segunda secuencias homosentido y la secuencia antisentido tienen por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud.

18. Un método para conferir resistencia a una planta que comprende un paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con gen de patogenicidad de la plaga y

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tienen por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud y comprenden una porción duplicada de dicho gen de patogenicidad de la plaga.

19. Un método para conferir resistencia a una planta que comprende un paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud,

donde dicho gen de patogenicidad de la plaga se selecciona del grupo que consiste en cutinasas, quinasas, ARN ribosómicos, adhesinas, elicitinas y proteínas G y donde dicha plaga es un hongo.

20. Un método para conferir resistencia a una planta que comprende un paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga;

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido y

(c) por lo menos dos promotores funcionales en la planta en orientación tal con respecto a las secuencias homosentido y antisentido que las secuencias homosentido y antisentido se transcriban en transcriptos separados,

donde dichos transcriptos separados son capaces de hibridizarse para formar una región de doble hebra,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud, y

donde dicha plaga es un hongo.

21. Un método para conferir resistencia a una planta que comprende un paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido,

donde cada una dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud,

donde dicho gen de patogenicidad de la plaga se selecciona del grupo que consiste en quinasas, ARN ribosómicos, proteínas G, factores de muda, serina proteasas, cisteína proteasas y esterasas de la hormona juvenil y

donde dicha plaga es un insecto.

22. Un método para conferir resistencia a una planta que comprende el paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido y

(c) por lo menos dos promotores funcionales en la planta en orientación tal con respecto a las secuencias homosentido y antisentido que las secuencias homosentido y antisentido se transcriban en transcriptos separados,

donde dichos transcriptos separados son capaces de hibridizarse para formar una región de doble hebra,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud, y

donde dicha plaga es un insecto.

23. Un método para conferir resistencia a una planta que comprende el paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido y

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud;

donde dicho gen de patogenicidad de la plaga se selecciona del grupo que consiste en quinasas, ARN ribosómicos, proteínas G, proteínas del colágeno de la cutícula y catepsina proteasas y

donde dicha plaga es un nematodo.

24. Un método para conferir resistencia a una planta que comprende el paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud;

donde dicho gen de patogenicidad de la plaga se selecciona del grupo que consiste en cutinasas, enzimas de maceración, quinasas, ARN ribosómicos, adhesinas y proteínas G; y

donde dicha plaga es una bacteria.

25. Un método para conferir resistencia a una planta que comprende el paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido heterólogo que comprende:

(a) una secuencia antisentido que tiene homología con un gen de patogenicidad de plaga y

(b) una secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha secuencia antisentido y

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra que comprende los nucleótidos codificados por la secuencia antisentido y la secuencia homosentido,

(c) por lo menos dos promotores funcionales en la planta en orientación tal con respecto a las secuencias homosentido y antisentido que las secuencias homosentido y antisentido se transcriban en transcriptos separados,

donde cada una de dichas secuencias homosentido y antisentido tiene por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos de longitud;

donde dicha plaga es una bacteria.

## RESUMEN

Se proporcionan métodos y materiales para conferir resistencia a plagas a plantas. Las plantas se transforman con una construcción de silenciamiento homóloga a un gen de una plaga de planta que es esencial para la supervivencia, desarrollo o patogenicidad de la plaga. Esto origina que la planta produzca ARNi para el gen seleccionado, el cual cuando es ingerido por la plaga produce el silenciamiento del gen y una posterior reducción de la capacidad de la plaga para dañar la planta. En otras realizaciones, la capacidad reducida de la plaga para dañar a la planta se transmite a la progenie de la plaga. También se proporcionan métodos y materiales para la eliminación de la patogenicidad de las plagas.

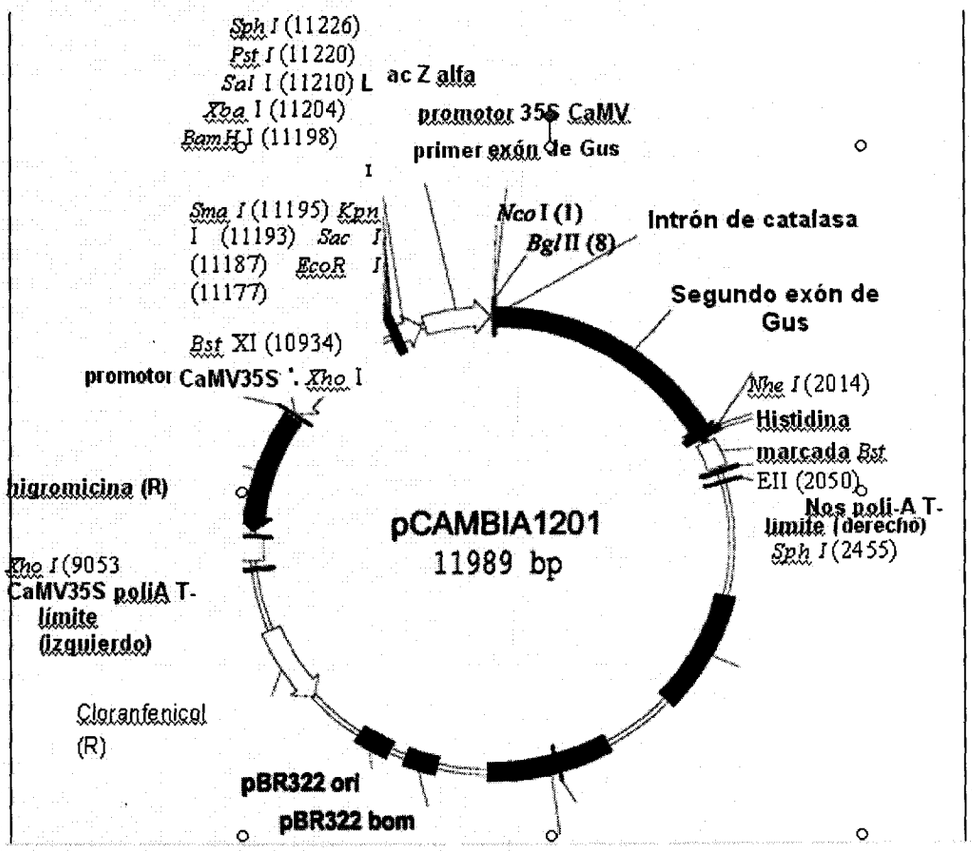
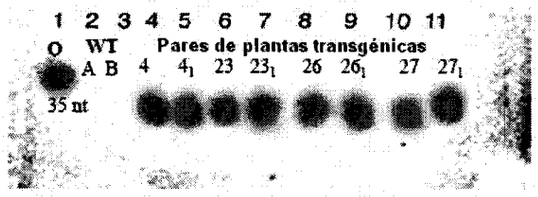
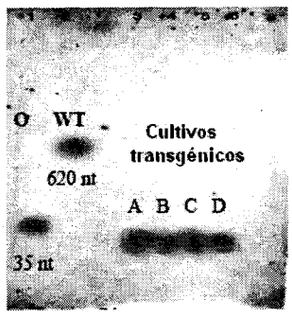

Sph I (11226)
Pst I (11220)
Sal I (11210)
Xba I (11204)
BamH I (11198)
ac Z alfa
promotor 35S CaMV
primer exón de Gus
Sma I (11195)
Kpn I (11193)
Sac I (11187)
EcoR I (11177)
Nco I (1)
Bgl II (8)
Intrón de catalasa
Segundo exón de Gus
Bst XI (10934)
promotor CaMV35S
Xho I
Nhe I (2014)
Histidina marcada
Bst EII (2050)
Nos poli-A T-límite (derecho)
Sph I (2455)
higromicina (R)
pCAMBIA1201
11989 bp
Xho I (9053
CaMV35S poliA T-límite (izquierdo)
Cloranfenicol (R)
pBR322 ori
pBR322 bom

FIGURA 1




Plantas de tabaco

Figura 4A




*Phytophthora nicotianae*

Figura 4B

FIGURA 4

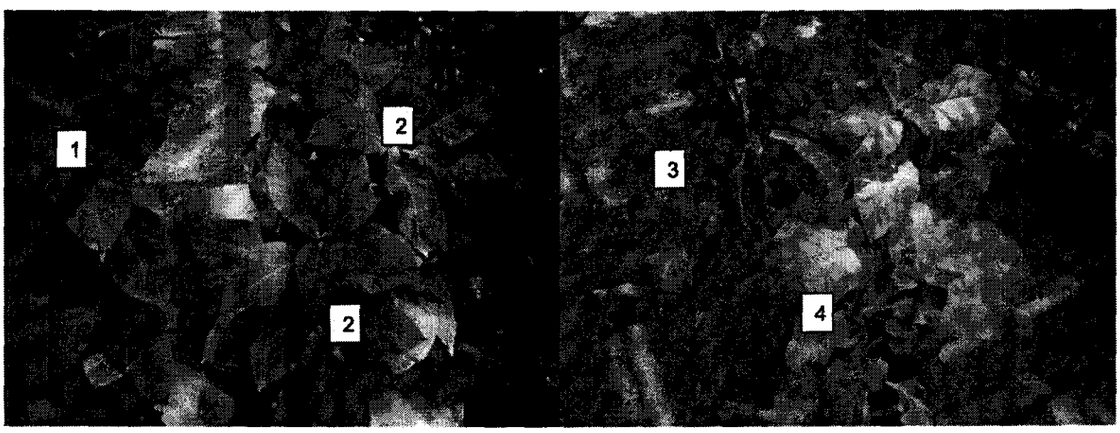



FIGURA 5

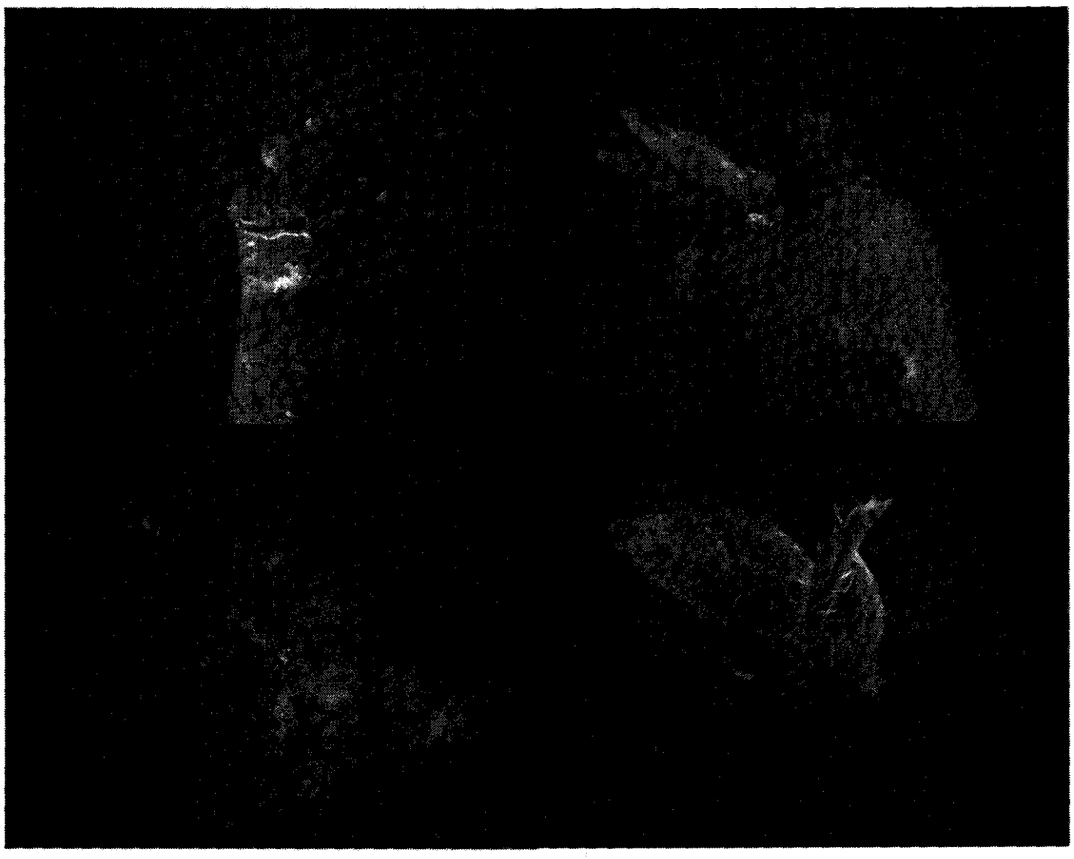
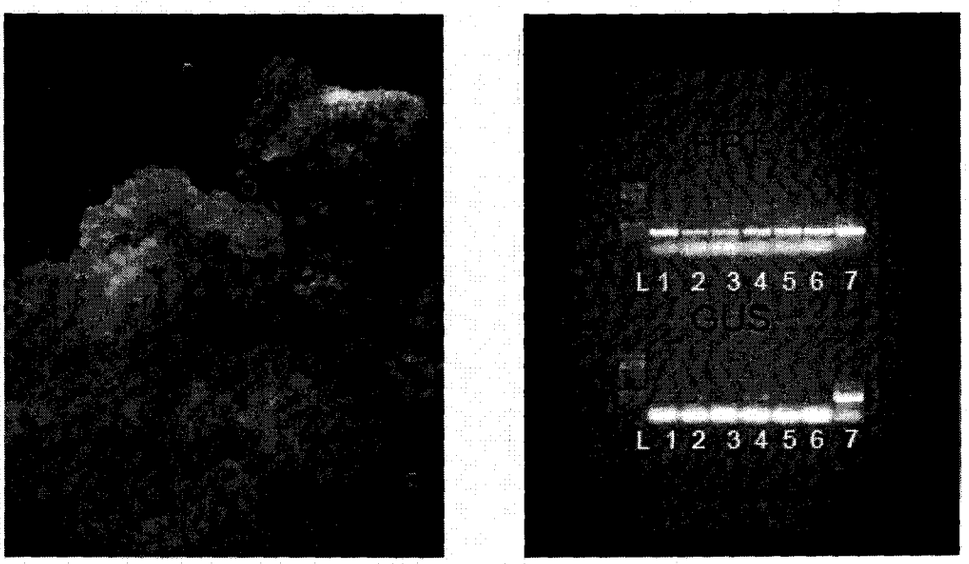


FIGURA 6




A B

FIGURA 7

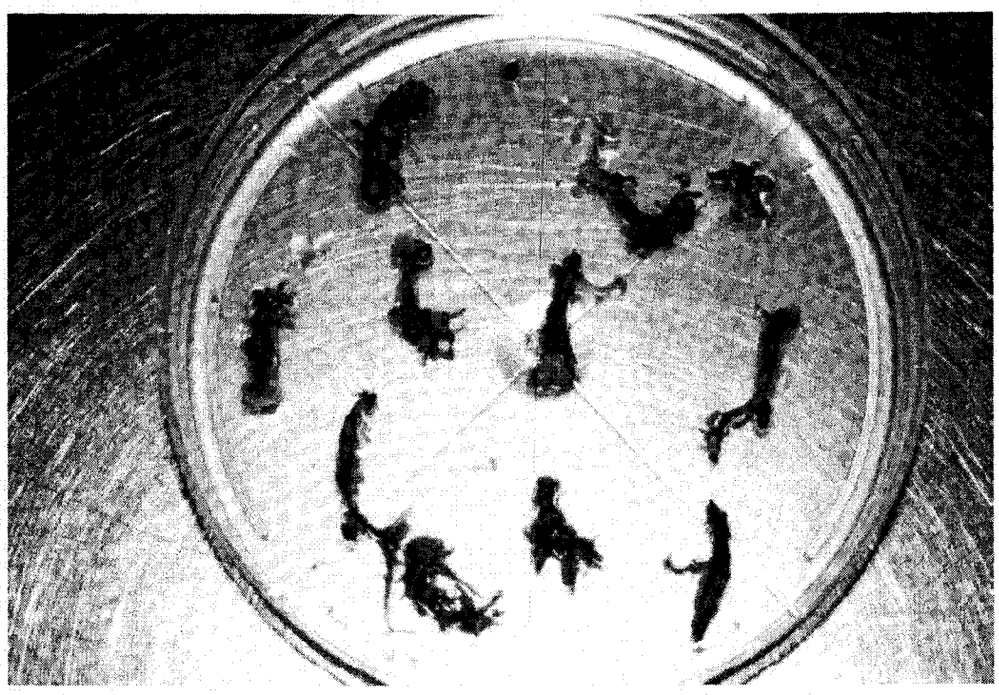


FIGURA 8

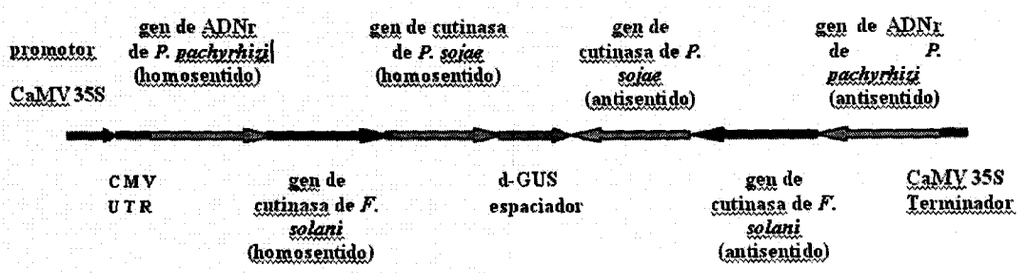



FIGURA 9

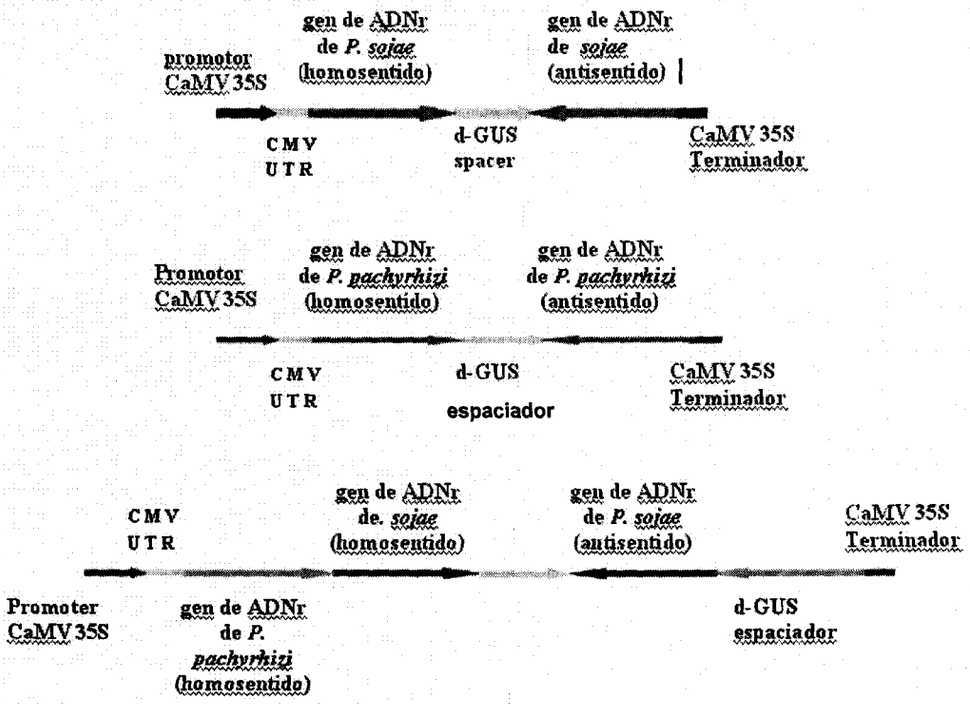

promotor CaMV 35S
gen de ADNr de P. sojae (homosentido)
gen de ADNr de sojae (antisentido)
CMV UTR
d-GUS spacer
CaMV 35S Terminador
Promotor CaMV 35S
gen de ADNr de P. pachyrhizi (homosentido)
gen de ADNr de P. pachyrhizi (antisentido)
CMV UTR
d-GUS espaciador
CaMV 35S Terminador
CMV UTR
gen de ADNr de. sojae (homosentido)
gen de ADNr de P. sojae (antisentido)
CaMV 35S Terminador
Promoter CaMV 35S
gen de ADNr de P. pachyrhizi (homosentido)
d-GUS espaciador

FIGURA 10

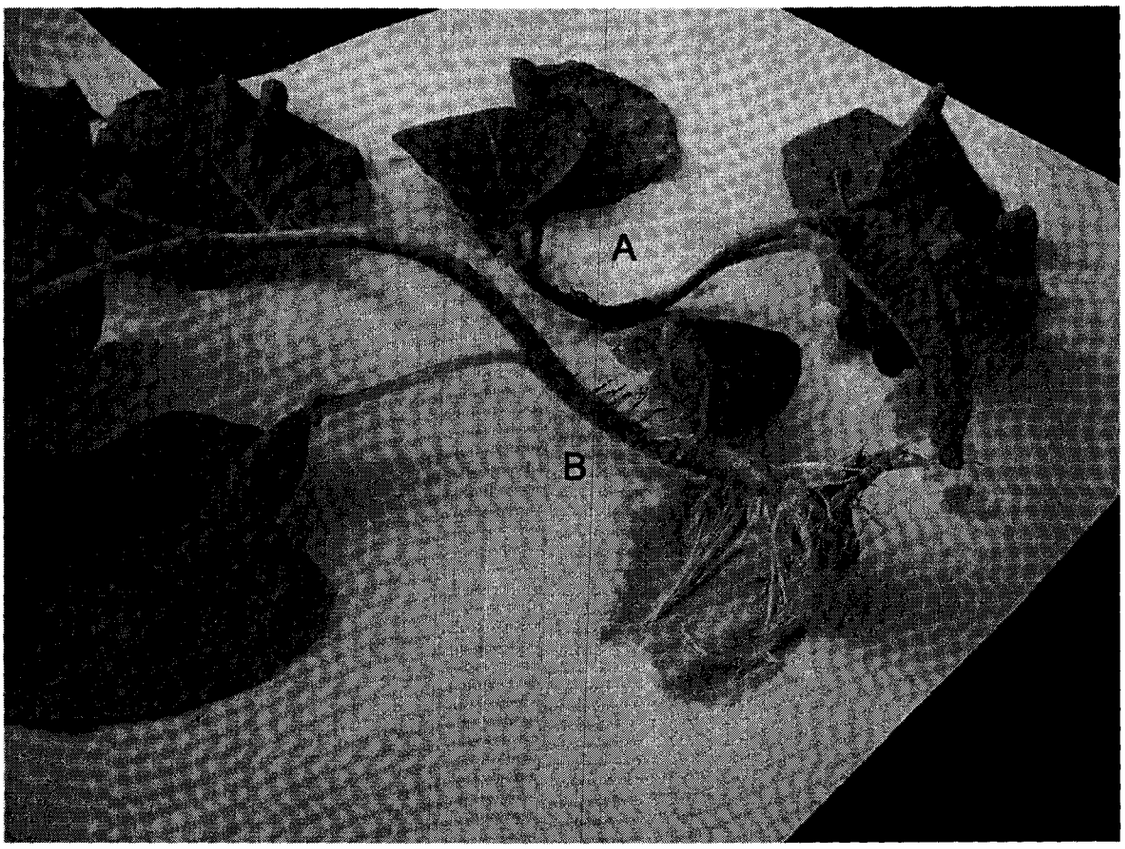



FIGURA 11

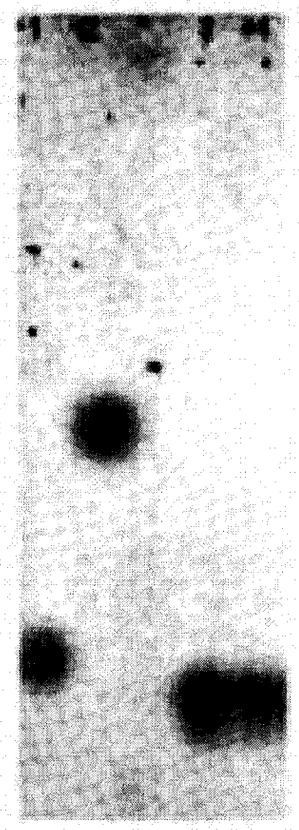



FIGURA 12

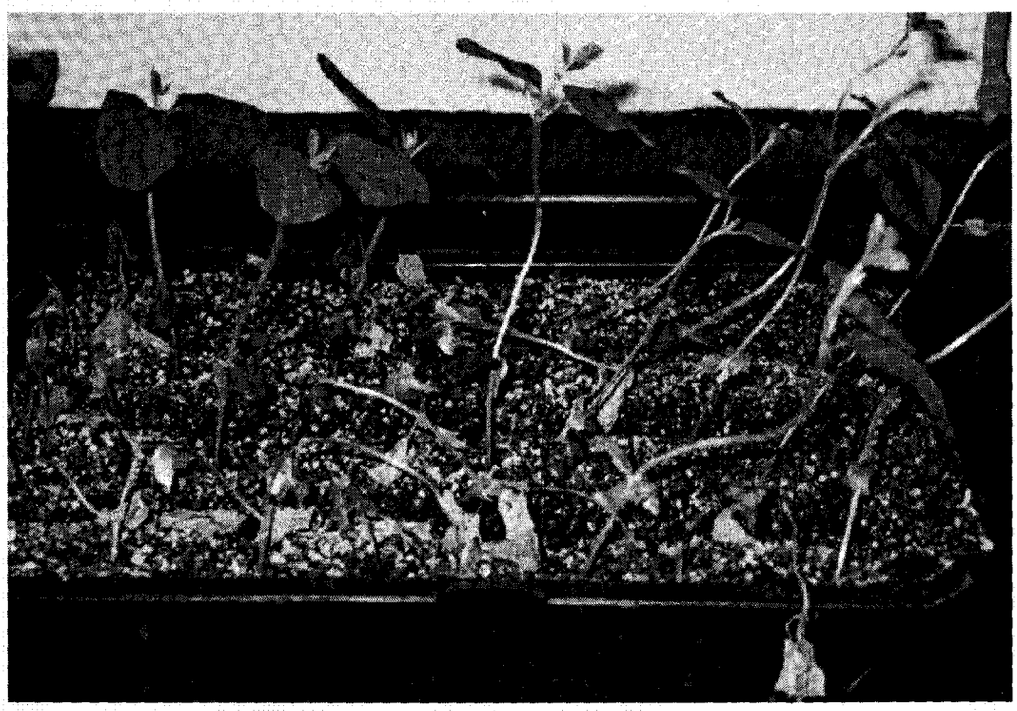


FIGURA 13

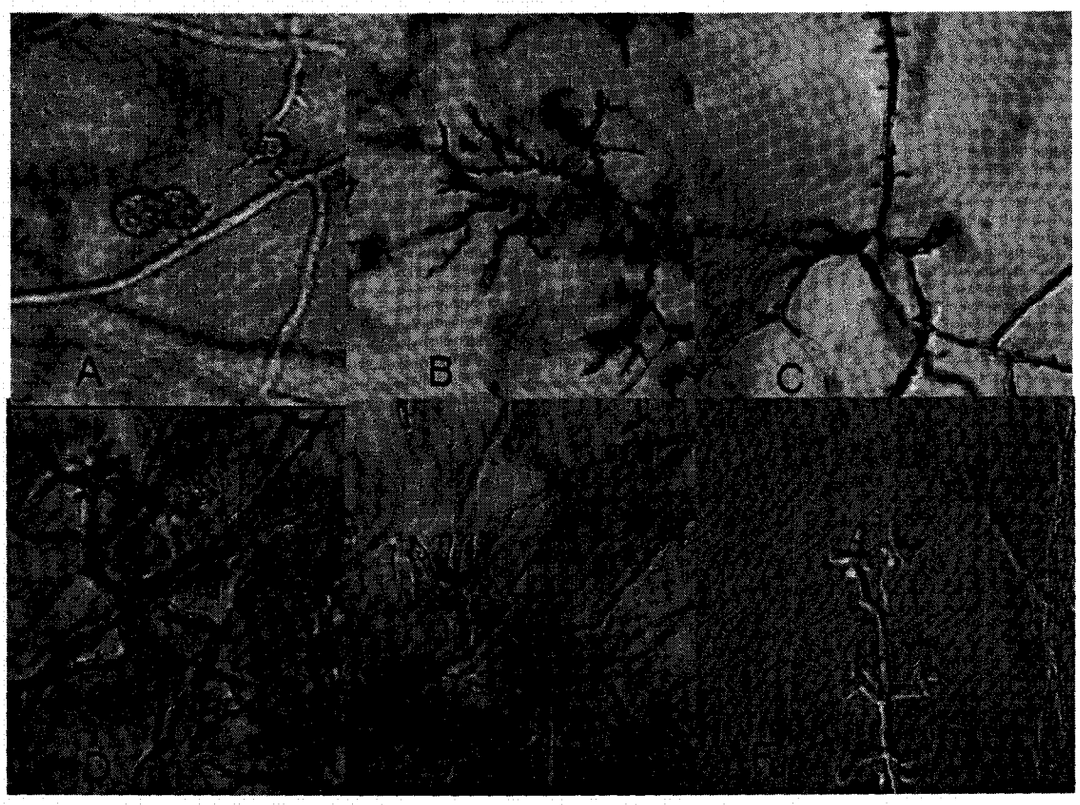



FIGURA 14

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

# SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
## DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
### EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
### SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

| | |
|---|---|
| (21) Nº de solicitud:<br><br>22) Fecha de solicitud:<br><br>(30) Prioridad (31) **Nº Prioridad** 32) **Fecha** (33) **País**<br>**60/621.542** **21/10/2004** **US**<br>**60/657.821** **01/03/2005** **US** | (51) int. Cl.:<br><br>(71)Solicitante(s) **VENGANZA INC.**<br><br>(72) Inventor(es) **CHARLES L. NIBLETT**<br><br>(74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS A.** |
| (85) Fecha limite inicio fase nacional:<br>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT<br>Fecha de presentación de la solicitud: **21/10/2005**<br>Nº de solicitud **PCT/US2005/038330** | (87) Publicación internacional<br>Fecha: **04/05/2006**<br>Nº publicación: **WO 2006/047495 A2** |
| (54) Titulo: **METODOS Y MATERIALES PARA CONFERIR RESISTENCIA A LAS PESTES Y PATOGENOS DE PLANTAS** | |

Reivindicación(es):

Un método para conferir resistencia a plagas a una planta que comprende un paso de transformación de una célula de planta hospedante con un polinucleótido heterólogo, dicho polinucleótido que comprende:

(a) una primera secuencia antisentido que presenta homología con un primer gen de patogenicidad de la plaga;
(b) una segunda secuencia antisentido que presenta homología con un segundo gen de patogenicidad de la plaga;
(c) una primera secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha primera secuencia antisentido; y
(d) una segunda secuencia homosentido sustancialmente complementaria a dicha segunda secuencia antisentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra que comprende nucleótidos codificados por la primera secuencia antisentido y la primera secuencia homosentido,

donde un transcripto del polinucleótido heterólogo es capaz de hibridizarse para formar una región de doble hebra que comprende nucleótidos codificados por la segunda secuencia antisentido y la segunda secuencia homosentido y

donde cada una de dichas primera y segunda secuencias homosentido y primera y segunda secuencias antisentido tienen aproximadamente 19 nucleótidos de longitud.

339
338

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-039512- -00000-0000

Fecha: 2007-04-20 14:25:01 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 339

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 32,072
FECHA : ABRIL 20 DE 2007

***** C O N S I G N A C I O N *****

| DEPOSITANTE | TIPO PAGO | BANCO | CUENTA | No. PAGO | FECHA PGO | Vr. PAGO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ALVARO CASTELLANOS | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 63071326 | 20/04/2007 | 5,334,000.00 |

***** C O N C E P T O *****

| CANT. | RENTISTICO | CONCEPTO | TOTAL CONCEPTO |
|---|---|---|---|
| 1 | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 482,000.00 |
| | | TOTAL : $ | 482,000.00 |

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

339

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

[redacted]

...NUECREACIONE
...378 FASENACIONALI
Folios: 339

Industria y Co
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

# REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRÁMITE

| | USUARIO | RADICADOR |
|---|---|---|
| **PATENTE DE INVENCION ( X ) MODELO DE UTILIDAD ( )** | (X) | ( ) |
| - Indicación de que se solicita la concesión de una patente | ( X ) | ( ) |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | ( X ) | ( ) |
| - Descripción de la invención | ( X ) | ( ) |
| - Dibujos de ser estos pertinentes | ( X ) | ( ) |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas | ( X ) | ( ) |

**COMPLETA ( X ) INCOMPLETA ( )**

**DISEÑO INDUSTRIAL ( )**

| | | |
|---|---|---|
| - Indicación de que se solicita el registro de 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 ( )**

**EZQUEMA DE TRAZADO ( )**

| | | |
|---|---|---|
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial | ( ) | ( ) |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | ( ) | ( ) |
| - Representación gráfica del Esquema de Trazado | ( ) | ( ) |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas | ( ) | ( ) |

**COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )**

Firma responsable: Edwar Navarro

Fecha: 20 / Abril / 2007