

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 863**

21 Número de solicitud: 201690065

51 Int. Cl.:

C12N 15/82

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

04.06.2015

30 Prioridad:

06.06.2014 US 62/008,934

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.07.2017

71 Solicitantes:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
395 Pine Tree Road, Suite 310
14850 Ithaca US**

72 Inventor/es:

**ALDWINCKLE, Herb;
COX, Kerik;
BOREJSZA-WYSOCKA, Ewa;
HILY, Jean-michel y
CHA, Dong Ho**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **Composiciones y métodos para determinar la alimentación por psílicos**

57 Resumen:

Composiciones y métodos para determinar la alimentación por psílicos.

La invención se relaciona con una planta que incluye un transgén que codifica un polipéptido heterólogo que confiere en la expresión de planta dicha resistencia de polipéptidos a un insecto hemipteroide que succionan la savia. El transgén también se expresa en un componente vegetal (tal como una hoja). Típicamente, la expresión de tales polipéptidos disuade la alimentación por insectos tales como psílicos (tales como psílicos cítricos asiáticos, psílicos cítricos africanos o psílicos cítricos americanos). Los ejemplos de plantas útiles en la invención son plantas cítricas o solanáceas.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ALIMENTACIÓN POR PSÍLIDOS

DESCRIPCIÓN

5 Referencia cruzada con los documentos relacionados

Esta solicitud reivindica beneficio del documento EEUU No. 62/008,934, archivado el 6 de junio de 2014, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se relaciona generalmente con el campo de plantas que expresan proteínas inhibitorias de insectos. En particular, la presente invención se relaciona con proteínas que exhiben actividad inhibitoria de insectos contra plagas relevantes en la agricultura de plantas de cultivo tales como plantas solanáceas y cítricas particularmente las plagas de insectos hemipteroides que succionan la savia, tales como el psílido cítrico asiático, el psílido cítrico africano, el psílido cítrico americano y el psílido de patata/tomate, 15 *Bactericera cockerelli*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los psílidos son pequeños insectos que se alimentan de floema que típicamente se alimentan de una sola planta, o de unas pocas plantas relacionadas. Pueden servir como vectores para diferentes especies microbianas que pueden actuar como plagas de plantas. 20 También se sospecha que entregan toxinas a las especies vegetales a medida que se alimentan, que causan patogénesis.

Los psílidos cítricos de Asia, África, y América son pequeñas plagas de insectos que se alimentan de las hojas y tallos de los árboles cítricos. Estos psílidos transmiten una enfermedad bacteriana llamada Huanglongbing (HLB), también conocida como enfermedad 25 de los cítricos. Todos los cítricos y especies cercanamente relacionadas son anfitriones susceptibles para tanto insectos psílidos cítricos como la enfermedad HLB. Esta enfermedad bacteriana es transmitida a árboles saludables mediante el psílido después de que se alimentan de tejido vegetal infectado. Una vez se infecta un árbol cítrico con HLB, no hay cura y la planta eventualmente morirá. La mejor forma actualmente para prevenir que la 30 enfermedad mate árboles cítricos es detener estos psílidos cítricos.

El psílido de patata/tomate, *Bactericera cockerelli*, ha sido una antigua plaga de cultivos solanáceos, que incluyen patatas, tomates, pimientos y berenjenas. Puede dañar plantas a través de alimentación directa, se sospecha que entrega una toxina de planta, y también transmite los patógenos bacterianos *Liberibacter psyllaureus* y *Liberibacter solanacearum*. 35 En patatas, se cree que causa una enfermedad sistémica denominada amarillos psílidos que incluye una reducción en el crecimiento, amarillamiento de las hojas, erección de nuevo follaje, anomalías foliares, entrenudos acortados y engrosados, nódulos agrandados, tubérculos aéreos, senescencia prematura y muerte temprana de las plantas. En tomates, los síntomas de follajes son similares a los de las patatas, y se puede disminuir el conjunto 40 de frutas, tamaño, textura y rendimiento. El *B. cockerelli* y la transmisión de *L. solanacearum* también han sido vinculadas con la enfermedad de la viruela cebrada en las patatas, lo que provoca el retraso del crecimiento, clorosis, entrenudos hinchados del crecimiento superior, proliferación de los brotes axilares, tubérculos aéreos, pardeamiento del sistema vascular, chamuscamiento de las hojas y muerte prematura de las plantas. Se 45 han usado diferentes insecticidas contra *B. cockerelli*, sin embargo, recientemente se ha

detectado algo de resistencia a tratamientos comunes en poblaciones de psílicos en California (Butler y Trumble, *Terrestrial Arthropod Reviews*, 5, 87-111, 2012).

No hay disponible actualmente ningún método de control que elimine psílicos y el riesgo de transmisión de patógenos dentro de una plantación de cítricos o campos de cultivos solanáceos. Los métodos para suprimir la infestación de psílicos probablemente disminuirán la propagación de la enfermedad y mantendrá la viabilidad económica de la producción agrícola.

Es en vista de estas cuestiones que se desarrolló la invención descrita aquí.

Resumen de la invención

Se ha descubierto que son útiles diferentes genes de los hongos de *Hirsutella* que colonizan insectos y de *Allium* (la familia de la cebolla) y otros genes que es aquí, cuando se expresan en plantas transgénicas, para inhibir la alimentación por insectos psílicos. Por consiguiente, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico purificadas, vectores (tales como vectores de expresión), células, plantas y componentes vegetales, productos y métodos útiles para proteger las plantas de enfermedades, por ejemplo, el verdeado de los cítricos y la enfermedad de las virutas de cebrá causada por psílicos.

En un aspecto, la invención presenta una planta que incluye un transgén que codifica un polipéptido heterólogo, el polipéptido que confiere, en una planta que expresa el polipéptido, resistencia (como se describió aquí) a una plaga de insectos hemipteroides que succionan la savia. En realizaciones preferidas, el insecto es un psílido tal como los psílicos cítricos asiáticos. En otras realizaciones preferidas, la planta es resistente a la infestación por psílicos. En aún otras realizaciones preferidas, la planta resistente a la alimentación por psílicos. La invención por consiguiente presenta plantas que no son atractivas a insectos que succionan la savia. En realizaciones particularmente preferidas, la planta es una planta cítrica. Las plantas a manera de ejemplo por consiguiente incluyen cualquier miembro de la familia ruda que incluyen, pero no están limitados a, naranja, limón, lima, y plantas de pomelo. Preferiblemente, el transgén está vinculado operativamente a secuencias regulatorias (tales como secuencias regulatorias heterólogas) para expresión del polipéptido, y en el que las secuencias regulatorias incluyen un promotor (por ejemplo, un promotor constitutivo o un promotor específico celular tal como un promotor activo en las células del floema o en el floema de una planta). Los polipéptidos a manera de ejemplo son sustancialmente idénticos a HtA (nativo), HtA (corto), ASAL (nativo), ASALR (nativo), ASALR (corto), ACA (nativo), ACA (corto), ACT (nativo), o ACT (corto), MpNPR1 o CsNPR1 como se describen aquí. En otras realizaciones preferidas, los polinucleótidos que codifican las polipéptidos se apilan según técnicas convencionales (como se describió aquí). También se contemplan las combinaciones de uno o más polinucleótidos en una planta transgénica o componente vegetal. Las plantas que expresan tales polinucleótidos típicamente evidencian un aumento del rendimiento comparado con una planta de control.

En otro aspecto, la invención presenta un producto derivado de una planta transgénica que expresa cualquier polinucleótido descrito aquí, en la que el producto incluye una cantidad detectable del transgén o un polipéptido expresado a partir del polinucleótido. Preferiblemente, el producto es un producto cítrico, o un producto de plantas solanáceas.

En aún otro aspecto, la invención presenta una planta progenie o semilla, en la que la planta progenie o semilla incluye un transgén que expresa uno o más de los polinucleótidos descritos aquí. En algunas realizaciones, la planta progenie o semilla incluye un gen resistente al herbicida que confiere resistencia al herbicida.

En otro aspecto, la invención presenta un polinucleótido que tiene identidad sustancial con HtA (nativo), HtA (corto), ASAL (nativo), ASALR (nativo), ASALR (corto), ACA (nativo), ACA (corto), ACT (nativo), o ACT (corto), MpNPR1 o CsNPR1 (cada uno descrito aquí), opcionalmente en el que el polinucleótido está vinculado operativamente con secuencia regulatorias para expresión del polipéptido, y en la que las secuencias regulatorias incluyen un promotor.

En otro aspecto, la invención presenta un constructo de expresión que incluye un polinucleótido que expresa uno o más polipéptidos que confieren en una planta resistencia a un insecto hemipteroide que succionan la savia. Los polinucleótidos a manera de ejemplo son aquellos que tienen identidad sustancial con HtA (nativo), HtA (corto), ASAL (nativo), ASALR (nativo), ASALR (corto), ACA (nativo), ACA (corto), ACT (nativo), ACT (corto), MpNPR1, o CsNPR1. En otras realizaciones preferidas, el polinucleótido es complementario con al menos 20 nucleótidos continuos de una secuencia seleccionada del grupo de HtA (nativo), HtA (corto), ASAL (nativo), ASALR (nativo), ASALR (corto), ACA (nativo), ACA (corto), ACT (nativo), ACT (corto), MpNPR1, o CsNPR1. En otras realizaciones preferidas, el polinucleótido está vinculado operativamente con una secuencia regulatoria heteróloga tal como un promotor CaMV 35S, un promotor tándem CaMV 35S, un promotor Shpx6b, un promotor SUS1, o un promotor CsSUS1. En aún otras realizaciones preferidas, el polinucleótido está vinculado operativamente con un terminador. En aún otras realizaciones preferidas, se expresa el polinucleótido en tejido de floema de una planta.

En otro aspecto la invención presenta una célula vegetal, una planta, o componente vegetal que incluye uno o más de los polinucleótidos o constructos de expresión descritos aquí. En particular, la invención presenta plantas que son miembros del género cítrico tal como *Citrus sinensis*, *Citrus sinensis* L. Osbeck 'Hamlin', o *Citrus sinensis* L. Osbeck 'Valencia'.

En aún otro aspecto, la invención presenta la propagación de cualquiera de las plantas transgénicas (tal como cítricas y de patata) como se describió aquí por propagación vegetativa.

En aún otro aspecto, la invención presenta un producto derivado de la célula vegetal, planta, o componente vegetal que incluye uno o más de los polinucleótidos descritos aquí, en la que el producto incluye una cantidad detectable del polinucleótido recombinante. En realizaciones preferidas, el producto es un producto cítrico o un producto solanáceo, que puede incluir, pero no está limitado a, cítricos, zumo de cítricos y concentrado de jugo de cítricos.

En otros aspectos, la invención presenta un método para controlar un insecto hemipteroide que succionan la savia, el método que incluye exponer el insecto a la célula vegetal, planta, o componente vegetal que incluye uno o más de los polinucleótidos descritos aquí, en la que la planta vegetal, planta, o componente vegetal expresa un polipéptido que inhibe alimentación, por ejemplo, directamente o indirectamente, por el insecto. En general, el método, por ejemplo, implica hacer que una planta sea menos atractiva para alimentación o infestación por psílicos.

En otro aspecto preferido, la invención presenta un método para hacer una planta resistente a verdeado cítrico, el método que incluye los pasos de introducción en una célula vegetal, uno o más de los polinucleótidos descritos aquí; y que regenera a partir de la célula vegetal una planta transgénica que expresa una cantidad inhibitoria de insectos de un polipéptido codificado por el polinucleótido; y opcionalmente, que muestra resistencia a psílicos cítricos asiáticos como una propiedad de la planta cítrica transgénica o del componente vegetal cítrica transgénica. Nuevamente el método, en general, implica hacer una planta menos atractiva para alimentación o infestación por psílicos.

- En aún otro aspecto preferido, la invención presenta un método para hacer una planta resistente a enfermedad de la viruela cebrá y psílicos amarillos, el método que incluye los pasos de introducir en una célula vegetal, uno o más de los polinucleótidos descritos aquí; y que regenera a partir de la célula vegetal una planta transgénica que expresa una cantidad inhibitoria de insecto de un polinucleótido codificado por el polinucleótido; y, opcionalmente, que muestra resistencia a *B. cockerelli* como una propiedad de la planta solanácea transgénica o el componente vegetal solanácea transgénica.
- En otro aspecto, la invención presenta un método para obtener jugo cítrico, el método, en general, implica proveer fruta cosechada de una planta que expresa un polipéptido que confiere resistencia a una plaga de insectos hemipteroides que succionan la savia y extraen jugo cítrico de la planta tal como una fruta proporcionada de tal planta. En realizaciones preferidas, el jugo se extrae de una fruta de una planta cítrica tal como naranja, limón, lima, o pomelo. En otras realizaciones preferidas, el método adicionalmente implica concentrar el jugo cítrico. En aún otras realizaciones preferidas, el método implica adicionalmente fortificar el jugo cítrico (por ejemplo, vitaminas y nutrientes tiamina y potasio, vitamina D y calcio). Adicionalmente, si se desea, el método implica además fortificar el concentrado de jugo cítrico.
- En aún otros aspectos, la invención presentó método para obtener frutas cítricas tales como naranjas, limones, limas, y pomelo, el método que implica cosechar fruta de una planta que expresa un polipéptido que confiere resistencia a un insecto hemipteroide que succionan la savia.
- Por “molécula de ácido nucleico” o “polinucleótido” se indica una molécula, por ejemplo, ARN o ADN, que tiene una secuencia de dos o más enlaces covalentes, nucleótidos que ocurren naturalmente o modificados. La molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, individual o de cadena doble, y puede incluir nucleótidos modificados o no modificados, o mezclas o combinaciones de los mismos. También se incluyen diferentes sales, sales mezcladas, y formas de ácido libre.
- Por “fragmento de ácido nucleico” o “fragmento polinucleótido” se indica un segmento contagioso de una molécula de ácido nucleico. La longitud de un segmento de ácido nucleico puede variar desde al menos una base par (por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, o 450 pares de base) hasta la longitud completa de la molécula de ácido nucleico. Cuando una molécula de ácido nucleico se indica aquí como que tiene más de un fragmento de ácido nucleico, se entiende que estos fragmentos de ácido nucleico pueden ocupar porciones que no se superponen de la molécula de ácido nucleico.
- Por “identidad de secuencia” se indica (en el contexto de comparar la secuencia de una molécula de ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico con una secuencia referencia o comparar la secuencia de aminoácido de un polipéptido con una secuencia referencia) que la molécula de ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico tiene la misma secuencia como la secuencia referencia o tiene un porcentaje especificado de nucleótidos que son los mismos en las locaciones correspondientes dentro de la secuencia referencia, cuando la secuencia de longitud completa de la molécula de ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico está alineada óptimamente con la longitud completa de la secuencia referencia. Dentro de este contexto, se computa el porcentaje de nucleótidos que son los mismos entre dos secuencias con referencia a la longitud de la secuencia más larga. Se puede computar la identidad de secuencia entre ADN y ADN, ARN y ARN, o ADN y ARN. Cuando se computa una identidad de secuencia entre ADN y ARN, es bien apreciado en la técnica que

residuos de timidina sean equivalentes a residuos de uracilo para propósitos de este cálculo. Adicionalmente, es bien apreciado en la técnica que si el porcentaje de identidad de secuencia de la secuencia complemento inversa a la secuencia referencia es mayor que aquella de la secuencia directa, entonces el porcentaje de identidad de secuencia es la primera cantidad. El algoritmo Needleman-Wunsch, por ejemplo, se puede usar para determinar la identidad de secuencia basada en alineamientos globales óptimos. Se puede computar la identidad de secuencia entre polipéptidos así como de acuerdo con métodos estándar. Están disponibles públicamente los programas de ordenador para determinar secuencias de ácido nucleico o identidad de polipéptido (por ejemplo, explosión de proteína) en, por ejemplo, la página web del European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) o usando BLAST® que se encuentre la página web de la National Library of Medicine.

Por “sustancialmente idéntico” se indica (en el contexto de comparar la secuencia de una molécula de ácido nucleico un fragmento de ácido nucleico con una secuencia referencia de una molécula de ácido nucleico o comparar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con una secuencia referencia) que las secuencias tienen una identidad de secuencia, como se calculó mediante el uso de métodos descritos anteriormente, de al menos 85% (por ejemplo, al menos 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o incluso 100%).

Por “resistencia a una plaga vegetal” se indica un nivel de resistencia a una plaga (por ejemplo, un insecto hemipteroide que succiona la savia tal como un psílido tal como los psílicos cítricos asiáticos) en una planta transgénica (o componente vegetal o célula) mayor que el nivel de resistencia en relación con una planta control (por ejemplo, una planta no transgénica). En una realización, el nivel de resistencia a una plaga en una planta transgénica es al menos 5 a 10% (y preferiblemente 20%, 30%, o 40%) mayor que la resistencia de una planta control. En otras realizaciones, el nivel de resistencia a la plaga es 50% mayor, 60% mayor, y más preferiblemente incluso 75% o 90% mayor que una planta control; con hasta 100% de resistencia comparada con una planta control que es más preferida. Se mide el nivel de resistencia usando métodos convencionales. Por ejemplo, se ensaya el nivel de resistencia a un psílido comparando la no capacidad de atracción de una hoja transgénica para los psílicos versus una hoja control. En otro ejemplo, se ensaya el nivel de resistencia a infestación de psílicos. Y en aún otro ejemplo, se ensaya el nivel de resistencia a alimentación de psílicos en plantas transgénicas versus planta de control como una medida para determinar la efectividad de expresión de un polipéptido heterólogo para conferir resistencia a la planta como es descrito aquí.

Por “operativamente vinculado” se indica que un gen y una secuencia regulatoria están conectados de tal manera que permiten expresión del gen cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) están unidas a las secuencias regulatorias.

Por “polipéptido” o “proteína” se indica cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación post-traducciona (por ejemplo, glicosilación o fosforilación).

Por “célula vegetal” se indica cualquier célula de auto-propagación unida por una membrana semipermeable que contiene un plástido. Tal célula también requiere una pared celular si se desea propagación adicional. La célula vegetal, como es usada aquí incluye, sin limitación, cualquier célula obtenida de cultivos de suspensión de semillas, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, raíces, brotes, polen y microsporas.

Por “componente vegetal” se indica una parte, segmento, corte, líquidos, fibras, o un órgano obtenido de una planta intacta. Los componentes vegetales a manera de ejemplo incluyen, sin limitación, semillas, embriones somáticos, corteza, hojas, tallos, polen, raíces, brotes,

flores, zarcillos, frutos, troncos y portainjertos, jugos y concentrados de zumos, así como cualquier parte vegetal usada para la propagación vegetativa.

Por “transgén” se indica cualquier pieza de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, DNA) que se inserta por artificio en una célula, y se vuelve parte del genoma del organismo que se desarrolla a partir de aquella célula. Tal transgén puede incluir un gen que es parcialmente o enteramente heterólogo (es decir, foráneo) para el organismo transgénico, o puede representar un gen que tiene identidad de secuencia con un gen endógeno del organismo.

Por “transgénico” se indica cualquier célula que incluye una molécula de ácido nucleico aislada (por ejemplo, una secuencia de ADN) que se inserta por artificio en una célula y se vuelven parte del genoma del organismo que se desarrolla a partir de aquella célula. Como es usado aquí, los organismos transgénicos son generalmente plantas transgénicas y el ADN (por ejemplo, un transgén) se inserta por artificio en el genoma nuclear o plastídico. Una planta transgénica puede contener una o más de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas aquí.

Como se discutió aquí, se han identificado varios polinucleótidos, aislados o diseñados, y caracterizados, que son útiles en proporcionar resistencia contra psílicos. Por consiguiente, la invención proporciona un número de importantes avances y ventajas para la protección de plantas contra plagas. Por ejemplo, la invención facilita un método efectivo y económico para protección en la planta contra plagas de planta mediante disuasión de alimentación de plagas de insectos. Tal protección contra plagas reduce o minimiza la necesidad de prácticas químicas tradicionales (por ejemplo, aplicación de bactericidas o insecticidas o ambos) que son usados típicamente por granjeros para controlar el esparcimiento de plagas de planta y proporcionar protección contra plagas que causan enfermedades tal como los psílicos cítricos asiáticos y los psílicos de patata/tomate. Adicionalmente, debido a plantas con uno o más de los polinucleótidos descritos aquí son menos vulnerables a plagas y sus enfermedades, la invención proporciona adicionalmente mayor eficiencia de producción, así como para mejorar la calidad y rendimiento de una planta de cultivo agrícola tal como plantas de cultivos cítricos y plantas solanáceas. De esta forma, la invención contribuye a la producción de productos agrícolas cítricos de alta calidad y alto rendimiento, por ejemplo, frutas, jugos, así como cultivos que tienen puntos, defectos, y manchas reducidas que son causados por plagas que incluyen verdeado reducido debido a HLB; los productos agrícolas con mayor vida útil y menores costos de manipulación; y alta calidad y producción de cultivos para fines agrícolas, industriales y comerciales. Adicionalmente, porque la invención reduce la necesidad de protección química contra plagas de planta, la invención beneficia el ambiente donde los cultivos crecen.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Esta solicitud describe la producción de plantas transgénicas o componentes vegetales transgénicos que tienen resistencia a plagas de psílicos, en, por ejemplo, deteriorar la alimentación o infestación por psílicos en plantas cítricas transgénicas o componentes vegetales tales como, pero no limitados a, ‘Hamlin’ o naranjas dulces ‘Valencia’, tomate, y patata.

Polinucleótidos y polipéptidos inhibidores de plagas de insectos

Los polinucleótidos sustancialmente idénticos a las siguientes secuencias son útiles para generar plantas transgénicas que tienen resistencia al insecto hemipteroide que succiona la savias (tal como para hacer una planta o componente vegetal no atractivo a, por ejemplo, psílicos). Las secuencias de polinucleótidos sintéticas pueden ser diseñadas de manera que serán expresadas en plantas. Son conocidas en la técnica una variedad de métodos

estándar para sintetizar genes de planta para mejorar el nivel de expresión de la proteína codificada por el gen sintetizado. Tales métodos, en general, se relacionan con la modificación de las secuencias de genes estructurales del transgén exógeno, para causarles a estos ser transcritos más eficientemente, procesados, traducidos y expresados por la planta. Las características de los genes que son bien expresados en plantas incluyen eliminación de secuencias que pueden causar empalme de intrones indeseados o poliadenilación en la región que codifica de un transcrito de gen mientras retiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos del polipéptido expresado.

1. Hirsutellin A ("HtA"): un gen de ribotoxina del hongo, *Hirsutella*

a. "Nativo"

ATGAAGGCCTTTACTGCCATTCTCGCCAGCGCGGCCTTGTTGCCACCGGCCTCGCGG
CTCCCGCCTCAGAAGCCACCTCGGTGAACAGCCTGGAAGAGCGCGCTCCCATCGTCAC
CTGCCGGCCCAAGCTCGACGGGCGGGAGAAGCCGTTCAAGGTAGACGTGGCGACGGC
GCAGGCACAGGCGCGCAAGGCGGGCCTGACGACGGGCAAGAGCGGCGACCCTCACC
GGTACTTCGCCGGCGACACATCCGCTGGGGCGTCAACAACCTGCGACAAGGCGGACG
CGATCCTGTGGGAGTACCCGATCTACTGGGTGCGCAAGAACGCCGAGTGGGCGCAAGG
ACGTCAAGACGTGCGAGCAAAAGGGAGGGCCGACGCCGATCCGCGTCTGTCTACGCCA
ACAGCAGGGGGCGCCGTGCAGTACTGCGGCGTCATGACGCAAGGTGCGACAAGA
ATAACCAGGGCAAGGAGTTCTTTGAGAAGTGCGATTAG (SEQ ID NO: 1)

b. Polipéptido:

Met K A F T A I L A S A A L F A T G L A A P A S E A T S V N S L E E R A P I V T C R P K L
D G R E K P F K V D V A T A Q A Q A R K A G L T T G K S G D P H R Y F A G D H I R W
G V N N C D K A D A I L W E Y P I Y W V G K N A E W A K D V K T S Q Q K G G P T P I R
V V Y A N S R G A V Q Y C G V Met T H S K V D K N N Q G K E F F E K C D (SEQ ID NO:
2)

c. "Corto"

ATGGCTCCCATCGTCACCTGCCGGCCCAAGCTCGACGGGCGGGAGAAGCCGTTCAAG
GTAGACGTGGCGACGGCGCAGGCACAGGCGCGCAAGGCGGGCCTGACGACGGGCAA
GAGCGGGCGACCCTCACCGGTACTTCGCCGGCGACACATCCGCTGGGGCGTCAACAA
CTGCGACAAGGCGGACGCGATCCTGTGGGAGTACCCGATCTACTGGGTGCGCAAGAA
CGCCGAGTGGGCGCAAGGACGTCAAGACGTGCGAGCAAAAGGGAGGGCCGACGCCGAT
CCGCGTCTGTCTACGCCAACAGCAGGGGGCGCCGTGCAGTACTGCGGCGTCATGACGCA
CAGCAAGGTGCGACAAGAATAACCAGGGCAAGGAGTTCTTTGAGAAGTGCGATTAG (SEQ
ID NO: 3)

d. Polipéptido:

Met A P I V T C R P K L D G R E K P F K V D V A T A Q A Q A R K A G L T T G K S G D P
H R Y F A G D H I R W G V N N C D K A D A I L W E Y P I Y W V G K N A E W A K D V K T
S Q Q K G G P T P I R V V Y A N S R G A V Q Y C G V Met T H S K V D K N N Q G K E F F
E K C D (SEQ ID NO: 4)

2. ASAL: un gen de lectina de *Allium ampeloprasum*

a. Nativo:

ATGAGCGTGGCCACTGTAGCCACCATCCTAACCATTTTGGCATCTACATGCATGGCCAG
AAACGTATTGGTGAACAACGAAGGACTGTACGCAGGCCAATCCCTAGTCGAGGAACAG
TACACTTTTATAATGCAGGATGACTGCAACCTTGTACTGTATGAATACAGCACCCCATC

TGGGCCTCAAACACAGGCATCACCGGTAAAAATGGGTGCAGGGCCGTGATGCAGCCTG
ATGGCAACTTTGTCGTCTACGATGTAAAGGGGCGTGCCGTCTGGGCCAGTAACAGCAG
AAGAGGGAACGGGAACCTATATCCTGGTGCTTCAGAAGGACAGAAACGTTGTTATTTACG
GATCTGATATTTGGTCTACTGGCACATACCGGAAAAAAGTGGGTGGAAGTGTGTTATG
5 GCTATGAGTGGTACGGTCGATGGAGGCTCCGCGATTGGACCGGTAACAGTGAATCAGA
ATGTCACTGCCGTCCGAAAGGTTGCAGCAGCTGCTGCTGCTTGA (SEQ ID NO: 5)

b. Polipéptido:

Met SVATVATILTILASTC Met ARNVLVNNEGLYAGQSLVEEQYTFI
Met QDDCNLVLYEYSTPIWASNTGITGKNGCRAV Met QPDGNFVV
10 YDVKGRAVWASNSRRGNNGNYILVLQKDRNVVIYGSIDIWSTGT
Y RKKVGGTVV Met A Met SGTVDGGS AIGPVTVNQNVTA VRKVA AAA
A A (SEQ ID NO: 6)

3. ASALR: un gen de lectina de *Allium roseum*

a. Nativo:

ATGAGCGTGGCCACTGTAGCCACCATCCTAACCATTTTGGCATCTACATGCATGGCCAG
AAACGTATTGGTGAACAACGAAGGACTGTACGCAGGCCAATCCCTAGTCGAGGAACAG
TACACTTTTATAATGCAGGATGACTGCAACCTTGTACTGTATGAATACAGCACCCCATC
TGGGCCTCAAACACGGGCATCACCGGTAAAAATGGGTGCAGGGCCGTGATGCAGCCTG
20 ATGGCAACTTTGTCGTCTACGATGTAAAGGGGCGTGCCGTCTGGGCCAGTAACAGCAG
AAGAGGGAACGGGAACCTATATCCTGGTGCTTCAGAAGGACAGAAACGTTGTTATTTACG
GATCTGATATTTGGTCTACTGGCACATACCGGAAAAAAGTGGGTGGAAGTGTGTTATG
GCTATGAATGGTACGGTCGATGGAGGCTCCGCGATTGGACCGGTAACAGTGAATCAGA
ATGTCACTGCCGTCCGAAAGGTTGCAGCAGCTGCTGCTGCTTGA (SEQ ID NO: 7)

b. Polipéptido:

Met SVATVATILTILASTC Met ARNVLVNNEGLYAGQSLVEEQYTFI
Met QDDCNLVLYEYSTPIWASNTGITGKNGCRAV Met QPDGNFVV
YDVKGRAVWASNSRRGNNGNYILVLQKDRNVVIYGSIDIWSTGT
30 Y RKKVGGTVV Met A Met NGTVDGGS AIGPVTVNQNVTA VRKVA AAA
A A (SEQ ID NO: 8)

c. Corto:

ATGAGGAACCTACTGACGAACGGCGAAGGACTGTATGCAGGGCAATCCCTAGATGTAG
AACAGTACAAGTTTATAATGCAGGATGACTGCAACCTCGTATTGTACGAATACAGCACCC
35 CCATCTGGGCCTCAAACACCGGTGTCACTGGCAAAAACGGGTGCAGGGCTGTCATGCA
AAAGGACGGCAACTTTGTGGTCTACGATGTAAACGGGCGTCCCGTCTGGGCCAGTAAC
AGTGTAAGAGGGAATGGGAACCTATATCCTGGTGCTTCAGGAGGACAGGAACGTTGTCAT
TTACGGCTCTGATATTTGGTCTACTGGTACCTACAGAAGATGA (SEQ ID NO: 9)

d. Polipéptido:

Met LRNLLTNGEGLYAGQSLDVEQYKFIMet QDDCNLVLYEYSTPI
WASNTGVTGKNGCRAV Met QKDG NFVVYDVNGRPVWASNSVRG
40 NGNYILVLQEDRNVVIYGSIDIWSTGT YRR (SEQ ID NO: 10)

4. ACA: un gen de lectina de *Allium cepa* var. *aggregatum*

a. Nativo:

ATGAGCGTGGCCACTGTAGCCACCATCCTAACCATTTTGGCATCTACATGCATGGCCAG
AAACGTATTGGTGAACAACGAAGGACTGTACGCAGGCCAATCCCTAGTCGAGGAACAG
TACACTTTTATAATGCAGGATGACTGCAACCTTGTACTGTATGAATACAGCACCCCATC
TGGGCCTCAAACACGGGCATCACCGGTAAAAATGGGTGCAGGGCCGTGATGCAGCCTG
5 ATGGCAACTTTGTCGTCTACGATGTTAAGGGGCGTGCCGTCTGGGCCAGTAACAGCAG
AAGAGGGAACGGGAACTATATCCTGGTGCTTCAGAAGGACAGAAACGTTGTTATTTACG
GATCTGATATTTGGTCTACTGGCACATACCGGAAAAAAGTGGGTGGAACGTTGTTATG
GCTATGAATGGTACGGTCGATGGAGGCTCCGCGATTGGACCGGTAACAGTGAATCAGA
ATGTCACTGCCGTCCGAAAGGTTGCAGCAGCTGCTGCTGCTTGA (SEQ ID NO: 11)

10 b. Polipéptido:

Met S V A T V A T I L T I L A S T C Met A R N V L V N N E G L Y A G Q S L V E E Q Y T F I
Met Q D D C N L V L Y E Y S T P I W A S N T G I T G K N G C R A V Met Q P D G N F V V
Y D V K G R A V W A S N S R R G N G N Y I L V L Q K D R N V V I Y G S D I W S T G T Y
R K K V G G T V V Met A Met N G T V D G G S A I G P V T V N Q N V T A V R K V A A A A
15 A A (SEQ ID NO: 12)

c. Corto:

ATGAGAAACGTATTGGTGAACAACGAAGGACTGTACGCAGGCCAATCCCTAGTCGAGG
AACAGTACACTTTTATAATGCAGGATGACTGCAACCTTGTACTGTATGAATACAGCACCC
CCATCTGGGCCTCAAACACGGGCATCACCGGTAAAAATGGGTGCAGGGCCGTGATGCA
20 GCCTGATGGCAACTTTGTCGTCTACGATGTTAAGGGGCGTGCCGTCTGGGCCAGTAAC
AGCAGAAGAGGGGAACGGGAACTATATCCTGGTGCTTCAGAAGGACAGAAACGTTGTTAT
TTACGGATCTGATATTTGGTCTACTGGTACGTACAGGAAATGA (SEQ ID NO: 13)

d. Polipéptido:

Met R N V L V N N E G L Y A G Q S L V E E Q Y T F I Met Q D D C N L V L Y E Y S T P I W
25 A S N T G I T G K N G C R A V Met Q P D G N F V V Y D V K G R A V W A S N S R R G N
G N Y I L V L Q K D R N V V I Y G S D I W S T G T Y R K (SEQ ID NO: 14)

5. ACT, un gen de lectina de *Allium tuberosum*

a. Nativo:

ATGAGCGTGGCCACTGTAGCCACCATCCTAACCATTTTGGCATCTACATGCATGGCCAG
AAACGTATTGGTGAACAACGAAGGACTGTACGCAGGCCAATCCCTAGTCGAGGAACAG
TACACTTTTATAATGCAGGATGACTGCAACCTTGTACTGTATGAATACAGCACCCCATC
TGGGCCTCAAACACAGGCATCACCGGTAAAAATGGGTGCAGGGCCGTGATGCAGCCTG
30 ATGGCAACTTTGTCGTCTACGATGTTAAGGGGCGTGCCGTCTGGGCCAGTAACAGCAG
AAGAGGGAACGGGAACTATATCCTGGTGCTTCAGAAGGACAGAAACGTTGTTATTTACG
GATCTGATATTTGGTCTACTGGCACATACCGGAAAAAAGTGGGTGGAACGTTGTTATG
GCTATGAGTGGTACGGTCGATGGAGGCTCCGCGATTGGACCGGTAACAGTGAATCAGA
ATGTCACTGCCGTCCGAAAGGTTGCAGCAGCTGCTGCTGCTTGA (SEQ ID NO: 15)

40 b. Polipéptido:

Met S V A T V A T I L T I L A S T C Met A R N V L V N N E G L Y A G Q S L V E E Q Y T F I
Met Q D D C N L V L Y E Y S T P I W A S N T G I T G K N G C R A V Met Q P D G N F V V
Y D V K G R A V W A S N S R R G N G N Y I L V L Q K D R N V V I Y G S D I W S T G T Y
R K K V G G T V V Met A Met S G T V D G G S A I G P V T V N Q N V T A V R K V A A A A
45 A A (SEQ ID NO: 16)

c. Corto:

ATGAGAAACGTATTGGTGAACAACGAAGGACTGTACGCAGGCCAATCCCTAGTCGAGG
AACAGTACACTTTTATAATGCAGGATGACTGCAACCTTGTACTGTATGAATACAGCACCC
CCATCTGGGCCTCAAACACAGGCATCACCGGTAAAAATGGGTGCAGGGCCGTGATGCA
5 GCCTGATGGCAACTTTTGTCTGCTACGATGTTAAGGGGCGTGCCGTCTGGGCCAGTAAC
AGCAGAAGAGGGAACGGGAACCTATATCCTGGTGCTTCAGAAGGACAGAAACGTTGTTAT
TTACGGATCTGATATTTGGTCTACTGGTACGTACAGGAAATGA (SEQ ID NO: 17)

d. Polipéptido:

Met R N V L V N N E G L Y A G Q S L V E E Q Y T F I Met Q D D C N L V L Y E Y S T P I W
10 A S N T G I T G K N G C R A V Met Q P D G N F V V Y D V K G R A V W A S N S R R G N
G N Y I L V L Q K D R N V V I Y G S D I W S T G T Y R K (SEQ ID NO: 18)

6. MpNPR1: un gen regulatorio implicado en la resistencia basal de la planta en manzana

a. Secuencia de nucleótidos:

ATGGCTCATTGAGCCGAACCATCATCCTCTCTGAGCTTTACTTCATCACCCCATTTATCA
15 AATGGTTCAATAAGCCACAACCTTATCGTGTTCTGGCTCCGAATCGGTGCCAAGTCTTGA
AGTCATCAGTTTGTCCAAGCTTAGCTCTAGTTTGGAGCAGTTGTTGATTGATCCTGGCTG
TGACTATAGTGATGCTGATATCGTAGTTGAGGGGATTCTGTTGGTGTACACCGATGTA
TATTGGCTTCTAGGAGTGGATTTTTTCGCGAGCTATTCAAGCGAGAAAAGGGGTCTTCT
GGAAAGGAAGACAGGCCAAAGTACTGTATGAGTGATTTTCTGCCTTATGGCGATGTTGG
20 ATATGAAGCCTTCTTGGTTTTCTTAAGCTATGTGTATACTGGAAAGCTTAAGCCTTCTCC
CGTGGAGGTGTCAACCTGCGTTCACAATGTATGTGCCCATGACGCATGTAGACCTGCTA
TCAATTTCTGTTGTGAATTGATGTACGCCGCTTCCATTTTCAAATGCCCGATCTGTTTT
CGATATTCGAGCGGCGCCTTCTTAATTTTGTGGGAAAGCTCTGTACAGACAATGTTGTC
CCAATTCTCTTGGTTGCCTTCCATTGTGAGTTGAATCAGCTCATCGATCAGTGTGTAGAT
25 AGAGTGGCACGATCAGATATTGATGACATCTCTCTTGAAGAGGACTTCTGATGAGGT
TGTGAAGAAAATCAAATTTCTCGCCGCAATTATCAGCAGGATTCTGACCCAAACTTGCC
ACCTGCCGATCCCTTGATGAAAAGAGAATCCGAAGAATACATAAGGCTTTGGACTCGG
ATGATGTGCGAGCTTGTGAACTTCTTTTAACGGAGTCTAATATAACCTTAGATGAAGCCA
ATGCTCTCCATTATGCTGCAGCTTACTGCGATCCTAAGGTTGTGACCGAAGTGCTTGCT
30 CTGGGCCTCGCTGATGTTAACCTCCGGAATTCTAGGGGTTATACAGTGCTTCACATTGC
TGTGATGCGCAAAGAGCCATCAATTATTGTATTGCTACTGACTAAAGGAGCTCGTGCAT
CGGAGCTGACATCAGATGGTCAGAGTGCTGTTAGTATTTGCAGGAGGTTGACGAGACC
AAAGGATTACCATTCAAAAACAGAGCAGGGGCAAGAAGCAAACAAAGACCGAATATGCA
TCGATGTTCTAGAGAGGGAAATGCGGCGGAATCCAATGGCTGGAGATGCATCTATATCT
35 TCCCAAATAATGCCCGATGATCTGCACATGGAGTTGCTGAACCTGGAGAACAGAGTGGC
ATTGGCCCGATTGTTTTTCCCTGCGGAAGCCAAGCTAGCCATGGTCATTGCCCATGCGG
AGACATCTGAGTTTGTGCGCCATCATCATCGAAAGGATCAAGTGGGAATCTGATGGAG
GTAGATTTAAACGAGACCCCCACCGTGCAGAACAAAGACTTCATTCCAGGTTGGAAGC
CCTTATGAAAACAGTCCGTTTGGGTAGATGCTACTTCCCTCATTGCTCAGAAGTCCTGG
40 ATAAGTTCATCGATGACGACCTCCCTCATTTGTTTTACCTCGAGCCTGGCTCCTCCGAC
GAGCAGAAGGTAAAGAGGAGGCGTTTCATGGAGCTCAAGGAGGAAGTACAAAAGCAT
TTGACAAGGACAAGGCCGAGTGTAACCTCTCCGGATTGTCTTCATCGTCCTCCACGACA
TCTCCGGAAAAAATTGGTGCAAATCAGAAGGTTAGGGAACCGTGA (SEQ ID NO: 19)

b. Secuencia de polipéptidos:

45 MetAHS AEPSSSL SFTSSPHLSNGSISHNLSCSGSESVP SLEVISLSKLSSSLEQLLIDPGCDY
SDADIVVEGIPVGVHRCILASRSGFFRELKREKGSSGKEDRPKYCMSDFLPYGDVGYEAF
VFLSYVYTGKLKPSPEVSTCVHNVCAHDACRPAINFVVELMYAASIFQMPDLVSIFERRLLN

FVGKALSDNVVPILLVAFHCQLNQLIDQCVDVARSDIDDISLEKGLPDEVVKIKILRRNYQQ
 DSDPNLPPADPLHEKRIRRIHKALDSDDELVKLLLTESNITLDEANALHYAAAYCDPKVTE
 VLALGLADVNLNRSGYTVLHIAVMRKEPSIIVLLLTGARGASELTSDGQSAVSICRRLTRPK
 DYHSKTEQGGQAEANKDRICIDVLEREMRRNPMAGDASISSQIMPDDLHMELLENRVALARL
 5 FFPAEAKLAMVIAHAETSEFAAPSSSSKGSNNLMEVDLNETPTVQNKRLHSRLEALMKTVRL
 GRCYFPHCSEVLDFIDDDPLHFLYLEPGSSDEQKVRRRFMELKEEVQKAFDKDKAEENL
 SGLSSSSSTTSPEKIGANQKVREP (SEQ ID NO: 20)

7. CsNPR1: un gen regulatorio implicado en la resistencia basal de las plantas en cítricos

Las secuencias de CsNPR1 útiles son aisladas e identificadas de acuerdo con métodos
 10 estándares. Por ejemplo, se extrae ADN genómico de *C. sinensis* cv. *valencia* (Four Winds
 Growers, Winters, CA) que usa un kit de extracción de ADN de planta E.Z.N.A. de acuerdo
 con las instrucciones del fabricante (Omega Bio-Tek, Norcross, GA). Ya que no se ha
 publicado previamente ninguna secuencia de CsNPR1 de *C. sinensis*, se clona inicialmente
 15 una región genómica que incluye un fragmento 5' de la secuencia que codifica usando
 cebadores degenerados designados basados en alineamientos CLUSTAL hechos con
 secuencias mRNA de MpNPR1 de *Malus x domestica* (acceso GenBank EU624123.1). Se
 amplificará un fragmento de 1800-pb aproximadamente a partir de ADN genómico de *C.*
sinensis que usa cebadores CsNPR1degF1 (tggtgtgactatagtgatgct) (SEQ ID NO: 21) y
 20 CsNPR1degR1 (ccctaaccttctgattgcacc) (SEQ ID NO: 22) en una concentración final de 1 µM
 y GoTaq Hot Start Mastermix (Promega, Madison, WI). Los parámetros de ciclo serán 95°C
 por 2 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 1 minuto, y una elongación
 final de 72°C por 5 minutos.

Se lleva a cabo entonces la amplificación rápida de 5' de extremos genómicos (RAGE) de
 acuerdo con Liu et al. (*Plant Mol Biol Rep* 19:261-267, 2001) para clonar la región corriente
 25 arriba de la secuencia que codifica CsNPR1. Brevemente, se extrae el ADN genómico de
 hojas de *C. sinensis* cv. *valencia* que usa el kit midi de ADN de planta OMEGA SP de
 acuerdo con las instrucciones del fabricante (Omega Bio-Tek) y se realizan PCR usando
 cebadores designados inicialmente para templar cerca del extremo 5' en la secuencia que
 codifica CsNPR1. Progresivamente se obtienen fragmentos 5' corriente arriba que usan una
 30 estrategia del caminar del gen. Se clonan entonces todos los productos de PCR en un
 vector para secuenciación tal como pGEM-T fácil (Promega).

Constructos de expresión de planta

Se establece bien la construcción de casetes de expresión para uso en plantas tales como
 plantas solanáceas y cítricas. Los casetes de expresión son constructos de ADN donde
 35 varios promotores, que codifican, y secuencias de poliadenilación son vinculadas
 operativamente. En general, los casetes de expresión típicamente comprenden un promotor
 que está vinculado operativamente a una secuencia de interés que está vinculada
 operativamente con una región de poliadenilación o terminadora. En ciertas instancias que
 incluye, pero no está limitado a, la expresión de genes en una planta, también puede ser útil
 40 incluir una secuencia de intrón. Cuando se incluye una secuencia de intrón, está ubicada
 típicamente en la región líder 5' no traducida del transgén. En ciertas instancias, también
 puede ser útil incorporar secuencias no traducidas 5' específicas en un transgén para
 mejorar la estabilidad de la transcripción o para promover traducción eficiente de la
 transcripción.

Se puede usar una variedad de promotores en la práctica de esta invención. Se indica a una
 amplia clase de promotores útiles como "promotores" constitutivos que son activos en la
 mayoría de órganos de plantas a lo largo del desarrollo de la planta. Por ejemplo, el
 promotor puede ser un promotor viral tal como un promotor CaMV35S. Los promotores
 CaMV35S son activos en una variedad de tejidos de planta transformados y la mayoría de

órganos de plantas (por ejemplo, callo, hoja, semilla y raíz). Son particularmente útiles versiones mejoradas o duplicadas de los promotores CaMV35S. Otros promotores útiles son conocidos en la técnica.

También se pueden usar los promotores que están activos en ciertos tejidos de plantas (es decir, promotores específicos de tejido) para dirigir la expresión de proteínas inhibitorias de insectos divulgadas aquí. Ya que ciertas plagas de insectos tales como psílidos son insectos que succionan la savia que típicamente se alimentan mediante la inserción de sus probóscides en el tejido vascular de las plantas anfitrionas, los promotores que dirigen expresión de las proteínas inhibitorias de insectos o fragmentos de los mismos en el tejido vascular de las plantas transgénicas son particularmente útiles en la práctica de este invención. Los promotores específicos de floema a manera de ejemplo incluyen, sin limitación, el promotor de gen de peroxidasa *Shpx6b*. Otros promotores preferidos de floema útiles incluyen aquellos aislados de un gen de sintasa 1 de sacarosa (*SUS1*) tal como maíz, tabaco, cítricos, tabaco, o caña de azúcar. Una región promotora a manera de ejemplo de ciruela (*Prunus domestica* L. cv. Francesa Mejorada).

TCCAATGATTGCTCCCATTAGCTAATCAAATTAATAGTACATTATAGTATGATAAGATTCA
GCATATTCTTCAAACCTATCCTCTCATCTTTTTTTATTATAATGTGTGTACATAGTAATTA
AACATTAATCCAAAACCCAAGTTGGATTACATTAAACCCGTGAACCCAATGGGCTAGAAT
TGTAGGGTTTCATAGGGAACAACAACCTGCAAAGTCTAAAAAGTAAGAGAACTCTCGTG
AAACGGGGGATAGCATTTTTTTGGTCTCCGGGGCAGTAACAACATGATACATAGGATAACT
TTTCCGATACATATGACAACCTTCTCCACATGTCATGTTGTTATTGGCCGGGGATAGCAAA
ACAGTGCTATCCGCGGTATAGGTGAGTTTTTTTCTAAAAAGCGGCCAAAAGTCCGACT
TCTGAATCATCACCAACCAGCACCTTCGCCGATTAGACCCATGCATGCCCTCTTTCT
CTGCACTTTCCCTGACCGCCACATATTTATTTTTTATTTACACCTTAATTCCATGAATTT
GGTGCCCTTCAATGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAACCAGAAAATCCCAATGGATTTTTCTT
GTTGCCCAAGCCCGACAAAAAAGGCCAAATGCTTGAATATCAAGGCTTAAATTAACA
GCACAAAATTGATTAATCCTCTAATTTCTTTCCAAAAATCCTATCATATCCCATTTTCAATT
TGTGAATTTACGAATTAACCCCTGTTTTTTTGATGACTTCTTCGGTCTTCGGGTAAAGGAA
ATGAGACTGATAAAATGGATATAATAGATTTCCGACCACCCTGCTGGATTTTTTTTTTGC
CACTGCCCTTATTATCGTACGCTCCAAGTTTTTTTTTACTTGCCTATTTTGGTTCGCGGT
TCCACGCTATAAAGCGAGCTCACACCATCCACCAACCACCTCACTTCTCTTCTCTCGT
TTCCATAGGCTTTCTCTCTCTCTGTGTTCTTTGTCTAGGTACACCTCATTTTCTCTTCC
CATTTTTATTTTTCTTGTGTTCTTGTCTTCTTGTGTTGGGTATTTCTTTAGGCTATATGGT
CTTTGCTCTTTTTTTCTTTTGGTTCATCTCCCAATCACATAGATCAATGCCTTCTGAATG
TAGGGTTGAGTTTATTTGAGGGTATATACTCTGTTTTTGCTTTTCTGCACCAGTATTTGT
GCGGATCTCTGTTTTTAATTTTTTCCGTCIGCTTTTGTTTGTTGAAAGTGAAAAAGCTGT
TTATCTTTTTGACTGGTTGGTCTGTTTCACCTTCAACAAGCAACCAGTAGAAGAAGTGTT
TTTTCTTTATCTTGATGGTCTTTTTCAGCTTCTCTTTTGAGAAAAGATTGATTCTTGTC
CAATTCGCCAAATGCACCATTTTTATTTTTCTTCTTTGATAAAAAGCGTTTTCTCTGCTT
TTGCTAAGCACCTTAATTATTAATATTATAAGCCTGGATTTTTATGATGGGCTTGAAGCT
TTTTATCTGTCCGCCACTCTGCAAATCCTTTATGGGTGCATCTAATTATTACATAATTA
AAACCTGGATCTTTTTTTCATTATTCTTAACCACTATCTAAGGTTGCATCTTTGTTCAACCGC
ACTGCTCTAATTAACGTTTGTATGAGGTGGTTGGTGGATGGTGTGTTTGGTTTTGAAAA
CTAAAGAAATTAGTCTTCTAGAATAATAAATAATTAATAATAATAATATTATTATTATT
AAAGTCTTCCTGTTAATGTTGGAATTATTGACTTGGTGGTGAATTATCCATCTCTTTTATT
GCGAAGCTTCTGGATACCTTGTATACTCACGGCTTGCTTTGTACTTGCAGTTTTTGAAG
GTTCTCTGATTTACCAATCTGCTATCAATG (SEQ ID NO: 23)

ATG (en negrilla) muestra el codón de inicio del gen *SUS1*. Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores usados para estudio corriente abajo para realizar supresiones de constructos (en secuencias de 1379, 978 y 672 nucleótidos). Las secuencias en negrilla cursiva en SEQ ID NO:23 corresponden a elementos que confieren especificidad

de xilema en *Phaseolus vulgaris* descrito por la página web de Plant Care (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

Aún otro promotor específico de floema útil es el promotor sintasa-I de sacarosa de *Citrus sinensis* (CsSUS1p) (Singer et al., *Planta* 234:623-637 (2011).)

5 También se pueden usar los elementos potenciadores de la transcripción en conjunción con cualquier promotor que está activo en la célula vegetal o con cualquier elemento promotor basal que requiere un potenciador para actividad en una célula vegetal. Los elementos potenciadores de la transcripción pueden activar la transcripción en diferentes células vegetales y son usualmente 100-200 pares de bases largos. Los elementos potenciadores
10 pueden ser obtenidos mediante síntesis química o por aislamiento de elementos regulatorios que incluyen tales elementos, y pueden comprender nucleótidos de flanqueo adicionales que contienen sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar manipulación subsecuente. Los elementos potenciadores pueden ser ubicados típicamente dentro de la región 5' hacia el sitio tapa de ARNm asociado con un promotor, pero también puede estar localizado en
15 regiones que están 3' hacia el sitio tapa (es decir, dentro de una región 5' no traducida, un intrón, o 3' hacia el sitio de poliadenilación) para proporcionar niveles aumentados de expresión de genes vinculados operativamente. Tales potenciadores son bien conocidos en la técnica.

Adicionalmente secuencias líder 5' no traducidas pueden estar vinculadas operativamente a
20 una secuencia que codifica de interés en un casete de expresión de planta. De este modo el casete de expresión de planta puede contener una o más secuencias líder 5' no traducidas que sirven para aumentar la expresión del ácido nucleico vinculado operativamente que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente aquí.

Las secuencias que codifican péptidos que proporcionan la localización de cualquiera de los polipéptidos descritos aquí en orgánulos subcelulares pueden estar vinculadas operativamente a las secuencias que codifican el polipéptido particular. De esta forma se espera que polipéptidos que están vinculados operativamente a un péptido señal entren a la vía de secreción y puedan ser retenidos por orgánulos tales como el retículo endoplásmico o dirigido al vacuolo vinculando operativamente la retención apropiada o dirigiendo péptidos al
25 terminal en C del polipéptido. Los ejemplos de péptidos de dirección vacuolar así como péptidos para dirigir los plástidos vegetales son bien conocidos en la técnica.

Como se notó anteriormente, la secuencia de polinucleótidos de interés también puede estar vinculada operativamente a una región 3' no traducida que contiene una señal de poliadenilación. Esta señal de poliadenilación proporciona la adición de una secuencia de poliadenilato hacia el extremo 3' del ARN. El gen 3' de sintasa de nopalina de plásmido (NOS) que induce tumores (Ti) de *Agrobacterium* y las regiones no traducidas del gen 3' ssRUBISCO E9 de arveja contienen señales de poliadenilato y representan ejemplos no limitantes de tales regiones 3' no traducidas que pueden ser usadas en la práctica de está invención. Se entiende que este grupo de regiones de poliadenilación a manera de ejemplo
35 no son limitantes y que alguien experto en la técnica puede emplear otras regiones de poliadenilación que están citadas explícitamente aquí.

Se puede usar cualquiera de los elementos de expresión de planta mencionados anteriormente con un polinucleótido diseñado para expresar uno o más de los polipéptidos codificados por cualquiera de los polinucleótidos descritos aquí (tal como un polipéptido que
45 tienen identidad sustancial con HtA (nativo), HtA (corto), ASAL (nativo), ASALR (nativo), ASALR (corto), ACA (nativo), ACA (corto), ACT (nativo), o ACT (corto), MpNPR1 o CsNPR1) en una planta o componente vegetal. Se proporciona aquí los casetes de expresión de planta que incluye uno o más de los polinucleótidos descritos aquí que codifican uno o más de sus respectivos polipéptidos, o proteínas inhibitorias de insectos que codifican

fragmentos de los mismos que proporcionarán la expresión de uno o más polipéptidos en una planta. Se puede evaluar una secuencia de polinucleótidos expresable de planta preferida para expresión óptima en células de protoplastos derivados de las especies de plantas de interés o una especie de planta relacionada, o de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos aquí. Después de la selección de aquellas secuencias de polinucleótidos designadas que dan la mejor expresión, las secuencias seleccionadas son entonces transformadas en plantas estables para selección continua.

Los constructos de ADN que incluyen los casetes de expresión de planta descritos anteriormente son típicamente mantenidos en varios vectores. Los vectores contienen secuencias que proporcionan la replicación del vector y las secuencias vinculadas covalentemente en una célula anfitriona. Por ejemplo, los vectores bacterianos contendrán orígenes de replicación que permiten replicación del vector en uno o más anfitriones bacterianos. Los vectores de transformación de planta mediados por *Agrobacterium* típicamente comprende secuencias que permiten replicación en tanto *E. coli* como *Agrobacterium* así como una o más secuencias "frontera" posicionadas de manera que permiten la integración del casete de expresión en el cromosoma de la planta. Los genes que codifican marcadores seleccionables que confiere resistencia a antibióticos son también incluidos típicamente en los vectores para proporcionar su mantenimiento en huéspedes bacterianos.

Plantas transgénicas y métodos para obtener plantas transgénicas inhibitorias de insectos

También son proporcionados por esta invención los métodos de obtención de una planta transgénica (o un componente vegetal transgénico) capaz de inhibir plagas de insectos. Primero, se introducen los vectores de expresión adecuados para expresión de cualquiera de los polipéptidos divulgados aquí en una planta, una célula vegetal o un tejido de planta que usa técnicas de transformación de acuerdo con métodos estándar bien conocidos en la técnica. Después se obtiene una planta transgénica en contiene el vector de expresión de planta mediante regeneración de aquella planta transgénica de la planta, célula vegetal o tejido de planta que recibió el vector de expresión. El paso final es obtener una planta transgénica que expresa una cantidad inhibitoria de insectos del polipéptido. Las plantas transgénicas expresan cantidades inhibitorias de insectos o más polipéptidos (tal como sustancialmente idénticos a HtA (nativo), HtA (corto), ASAL (nativo), ASALR (nativo), ASALR (corto), ACA (nativo), ACA (corto), ACT (nativo), o ACT (corto), MpNPR1 o CsNPR1 o cualquier combinación de los mismos) contemplados aquí incluyen, pero no están limitados a, plantas solanáceas tales como tomate y patata y plantas cítricas tales como naranjas, limones, limas, y pomelo.

Se pueden introducir los vectores de expresión de planta en los cromosomas de una planta anfitriona a través de métodos tales como transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada de partícula, transfección de ADN, o electroporación de ADN, o mediante la llamada transformación mediada por bigotes. Los métodos a manera de ejemplo de introducción de transgenes son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, métodos para producción de cítricos transgénicos a través de la transformación mediada de *Agrobacterium* de tejido juvenil o adulto se describen en Orbović y Grosser, "Chapter 17: Citrus" in *Agrobacterium Protocols*, Segunda Edición, Volumen 2, Kan Wang, editor, Humana Press, Totowa, Nueva Jersey (2006).

Aquellos expertos en la técnica apreciarán adicionalmente que se puede usar cualquiera de estas técnicas de transferencia de genes para introducir el vector de expresión en el cromosoma de una célula vegetal, un tejido vegetal, una planta, o un componente vegetal.

Después de que se introduce el vector de expresión de planta en una célula vegetal o tejido vegetal, las células o tejidos transformadas o tejidos son regenerados típicamente en

plantas completas cultivando estas células o tejidos bajo condiciones que promueven la formación de una planta completa (es decir, el procedimiento de regeneración de hojas, tallos, raíces y, en ciertas plantas, tejido reproductivo). El desarrollo o regeneración de plantas transgénicas a partir de protoplastos de una sola planta o de diversos explantes es bien conocido en la técnica. Este procedimiento de regeneración y crecimiento típicamente que incluye los pasos de selección de células transformadas y cultivo de células seleccionadas bajo condiciones que producirán plántulas enraizadas. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan posteriormente en un medio de crecimiento de planta apropiado tal como el suelo. Las plantas transgénicas que tienen incorporados en sus genomas segmentos de ADN transgénico que codifican uno o más de los polipéptidos descritos aquí están dentro del alcance de esta invención. Se reconoce adicionalmente que plantas transgénicas que contienen los constructos de DNA descritos aquí, y materiales derivados de los mismos, se pueden identificar a través del uso de PCR u otros métodos que pueden detectar específicamente las secuencias en los constructos de ADN.

Una vez se regenera o recupera una planta transgénica, se puede usar una variedad de métodos para identificar u obtener una planta transgénica que expresa una cantidad inhibitoria de uno o más de los polipéptidos descritos aquí. Una configuración general de métodos es realizar ensayos que miden la cantidad del polipéptido que se produce. Alternativamente, se puede determinar la cantidad de ARNm producido por la planta transgénica para identificar plantas que expresan cantidades inhibitorias de insectos del polipéptido.

También se pueden identificar las plantas transgénicas que expresan cantidades inhibitorias de insectos del polipéptido mediante el ensayo directo de tales plantas para inhibición de insectos, por ejemplo como se describió aquí.

Control de plagas de insectos que succionan la savia

Se pueden usar las plantas transgénicas que incluyen polinucleótidos que codifican uno o más de los polipéptidos descritos aquí o fragmentos inhibitorios de insectos de los mismos en métodos de control de infestaciones de insectos.

Las plantas transgénicas a manera de ejemplo incluyen, sin limitación, plantas cítricas tales como, pero no limitadas a, naranjas dulces 'Hamlin' o 'Valencia' (*Citrus sinensis* L.), y plantas solanáceas tal como la patata (*Solanum tuberosum* L.).

Las plantas transgénicas de cítricos tales como una naranja transgénica (tal como 'naranja dulce Hamlin') y la patata o tomate que son atacadas por plagas de insectos succionadoras de savia inhibidas por uno o más de los polipéptidos descritos aquí son útiles en la agricultura.

Las plantas transgénicas preferidas (o componentes vegetales transgénicos) incluyen polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos descritos aquí o fragmentos inhibitorios de insectos de los mismos que están protegidos contra la alimentación o infestación de insectos que succionan la savia. Tales plantas transgénicas son particularmente efectivas para controlar especies de insectos hemipteroides que succionan la savia tales como psílicos que perforan y/o succionan los fluidos de las células y tejidos de plantas.

Se identifican primero las plantas transgénicas que expresan cantidades inhibitorias de insectos del polipéptidos inhibitorios de insectos o fragmentos inhibitorios de insectos de los mismos por uno de los métodos descritos aquí. Se puede conducir la inhibición de insectos inicial en condiciones ambientales controladas (es decir, en cámaras de crecimiento cerradas o invernaderos) que evalúan alimentación de insectos (por ejemplo, psílicos). También se pueden someter a las plantas transgénicas a infestación de insectos en pruebas

de campo y comparadas contra plantas de control no transgénicas. Si se desea, las plantas de control transgénicas incluirán tanto plantas tratadas con insecticidas como plantas no tratadas. Las líneas de plantas transgénicas (es decir, plantas transgénicas derivadas de eventos de transformación distintos que incluyen inserciones de transgenes en locaciones genéricas diferentes) que muestran la actividad inhibitoria de insectos (tal como hacer una planta menos atractiva a la infestación o alimentación de psílicos), son seleccionadas para desarrollo potencial para uso en una variedad de diferentes antecedentes genéticos (es decir, variedades genéticamente distintas, variedades y/o germoplasmas híbridos). Son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica los métodos de introgresión de transgenes en germoplasmas distintos y producir lotes de semilla que incluyen primariamente semillas transgénicas. Por ejemplo, se puede fijar el transgén en un estado homocigótico en un antecedente genético deseado. Una vez se fija el transgén en aquel antecedente, se puede usar la planta transgénica homocigótica para producir semillas transgénicas de cultivos no híbridos. Alternativamente, se puede usar la planta transgénica homocigótica como un donante de polen o recipiente para producir semillas transgénicas de cultivos híbridos.

En esta invención se contemplan tipos específicos de plantas transgénicas que expresan polipéptidos inhibitorios de insectos que inhiben plagas de insectos específicas. Se contemplan específicamente plantas cítricas transgénicas tales como, pero no limitadas, a plantas de naranjas 'Hamlin' o 'Valencia' que expresan polipéptidos inhibitorios de insectos que inhiben los psílicos cítricos asiáticos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son representativos de la invención. Los detalles específicos divulgados aquí no se deben interpretar como limitantes.

Ejemplo 1 – Constructos de expresión de plantas

Las representaciones esquemáticas de los constructos transformantes descritos aquí se muestran en las Tablas 1 y 2. Todos los vectores se produjeron usando protocolos estándar e incluyen pBINplus (van Engelen et al., Transgenic Res 4: 288-290, 1995) con un múltiplo PZP-RSC1 insertado (Hajdukiewicz et al., Plant Mol Biol. 25: 989-994, 1994) como antecedente, y se verificaron por secuenciación antes de la transformación. Todos los constructos contenían un promotor 35S parcialmente duplicado (indicado aquí como 35S, Kay et al., Science 236: 1299-1302, 1987), el promotor del gen de la peroxidasa Shpx6b de la leguminosa *Stylosanthes humilis* (Curtis et al., MPMI 10: 326-338, 1997), el promotor de sacarosa sintasa 1 (SUS1) de ciruela (*Prunus domestica* L. cv. Francés mejorada) clonado como se describió aquí, y el promotor de sacarosa sintasa-I de *Citrus sinensis* (CsSUS1) (Singer et al., Planta 234: 623-637, 2011) fusionado con el terminador transcripcional de la *nopalina sintasa* (nos-t). Se insertaron entonces todos los casetes de fusión *nos-t* de promotor en el sitio de clonación múltiple en un vector pBINplus y se clonaron en la cepa DH-5α de *Escherichia coli*, que usa el kit pGEMTeasy (Promega, Madison, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se obtuvieron versiones nativas y maduras (corto) de constructos de ADNc mediante amplificación por PCR de preparaciones de ADNc a partir de tejidos de *Hirsutella thompsonii*, *Malus x domestica*, *Allium cepa assagi* (ACA), *Al. Roseum* (ASALros) y *Al. Ampeloprasum* (ASAL). Los cebadores para la amplificación de las secuencias de ADNc nativo y maduro de HtA se obtuvieron de Boucias et al., J. de invert. Pathol. 72: 258 - 261, 1998, pero modificado para contener los sitios de restricción BamHI y SacI para facilitar la clonación, en el extremo 5' y 3', respectivamente. Los cebadores para la amplificación del ADNc de MpNPR1 se obtuvieron secuencias de ARNm de *Malus x domestica* (acceso GenBank EU624123.1), pero se modificaron para contener sitios de restricción BamHI y SacI para facilitar la clonación, en el extremo 5' y 3', respectivamente. Los cebadores para

los genes *Allium* nativos y maduros (corto) también se modificaron para contener los sitios de restricción BamHI y SacI para facilitar la clonación, y se diseñaron a partir de secuencias conocidas (acceso GenBank no. U58947 para ASAL y número de acceso L12172 para ACA). Estos cebadores son los siguientes:

- 5 ASAL nativo: cebador F 5'-GGCGGATCCATGGGTCCTACTACTTCATCTCCT-3' (SEQ ID NO: 24),
ASAL nativo: cebador R 5'-GGCGAGCTCTCAAGCAGCACCGGTGCCAACCTT-3' (SEQ ID NO: 25),
ACA nativo: cebador F 5'-GGCGATCCATGAGAAACGTATTGGTGAACAA-3' (SEQ ID NO: 26),
10 ACA nativo: cebador R 5'-GGCGAGCTCTCATTTCTGTACGTACCAGTAGA-3' (SEQ ID NO: 27),
ASAL maduro: cebador F 5'- GGCGGATCCATGAGGAACCTACTGACGAAC-3' (SEQ ID NO: 28),
15 ASAL maduro: cebador R 5'- GGCGAGCTCTCATCTTCTGTAGGTACCAGTAGA-3' (SEQ ID NO: 29),
ACA maduro: cebador F 5'- GGCGGATCCATGAGCGTGGCCACTGTAG-3' (SEQ ID NO: 30), y
ACA maduro: cebador R 5'- GGCGAGCTCTCAAGCAGCAGCAGCTGC-3' (SEQ ID NO: 31),
20 Todas las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando Platinum PCR SuperMix High Fidelity de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, San Diego, CA) con el siguiente perfil térmico: 94°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C ° C durante 30 segundos y 68 ° C durante 2 minutos.
Adicionalmente a los genes individuales, se prepararon dos casetes de fusión de gen. La
25 primera fue una fusión entre las secuencias maduras de HtA, ACA (de *Al. Cepa assagi*) y ASAL (*Al. Ampeloprasum*) denominada HtA::ACAas::ASALam. El segundo contenía la secuencia madura de la ACA y el gen ASAL de *Al. Roseum* y designado como ACARos::ASALros. El casete de fusión HtA::ACAas::ASALam se realizó por PCR con los siguientes cebadores:
30 HTA delantero 5'- GGATCCGAATTCGGCTTCATATGGCTCC-3' (SEQ ID NO: 32),
HTA cebador reverso 5'- CCCCGGGATCGCACTTCTCAAAGAACTCCT-3' (SEQ ID NO: 33),
ACAassagi cebador delantero 5'- CCCCGGGGAGAAACGTATTGGTGAACAACGA-3', (SEQ ID NO: 34),
ACAassagi cebador reverso 5'- GGTACCTTTCCGGTATGTGCCAGTAGAC-3' (SEQ ID NO: 35),
35 ASALampeloprasum cebador delantero 5'-GGTACCAGGAACCTACTGACCAACGGC-3' (SEQ ID NO: 36),
y
ASALampeloprasum cebador reverso 5'-GAGCTCTCACCTTCTGTAGGTACCAGTAGACC-3'.(SEQ ID NO: 37).
40

Similarmente, el casete de fusión ACARos::ASALros se hizo por PCR usando los siguientes cebadores:

ACARos cebador delantero 5'-CCCGGGATGAGAAACGTATTGGTGAACAACG-3' (SEQ ID NO: 38),

5 ACARos cebador delantero 5'-GGTACCTTTCCGGTATGTGCCAGTAGAC-3' (SEQ ID NO: 39),

ASALros cebador delantero 5'-GGTACCAGGAACCTACTGACCAACGGC-3' (SEQ ID NO: 40), y

10 ASALros cebador delantero 5'-GAGCTCTCACCTTCTGTAGGTACCAGTAGACC-3' (SEQ ID NO: 41).

Para la creación de ambos casetes de fusión, se usó el kit Platinum PCR SuperMix High Fidelity PCR Mix (Invitrogen, San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante con el siguiente perfil térmico: 94°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos.

15 Después de la preparación de los ADNc, se purificaron los vectores pBINplus de la fusión *nos-t* del promotor descritos anteriormente de la cepa DH-5α de *Escherichia coli*, y diversas combinaciones de los ADNc de genes individuales (por ejemplo, HtA nativo, ACA corto, MpNPR1, etc.) y se insertaron los casetes de fusión de genes maduros (es decir, HtA :: ACAas :: ASALam y ACARos :: ASALros) entre el terminador y promotor de nopalina sintasa

20 (*nos-t*) usando digestión con enzimas de restricción y ligación de acuerdo con la práctica habitual. Después de la ligación, los vectores se transformaron de nuevo en la cepa DH-5α de *Escherichia coli*, usando el kit pGEMTeasy (Promega, Madison, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para esperar la transformación en la cepa EHA105 de *Agrobacterium* para la transformación de plantas.

25 Tabla 1. Constructos

Nombre de Constructo	Promotor	Contenidos de casetes	Fuente de origen de genes expresados
JM202	CaMV35S	35S::35S:: <i>nos-t</i>	
JM220	CaMV35S	35S::35S::HtA nativo:: <i>nos-t</i>	<i>Hirsutella</i>
JM204	CaMV35S	35S::35S::HtA corto:: <i>nos-t</i>	<i>Hirsutella</i>
JM275	CaMV35S	35S::35S::ACA nativo:: <i>nos-t</i>	<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>
JM276	CaMV35S	35S::35S::ACA nativo:: <i>nos-t</i>	<i>Allium tuberosum</i>
JM277	CaMV35S	35S::35S::ACA corto:: <i>nos-t</i>	<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>
JM278	CaMV35S	35S::35S::ACA corto:: <i>nos-t</i>	<i>Allium tuberosum</i>
JM273	CaMV35S	35S::35S::ASAL nativo:: <i>nos-t</i>	<i>Allium roseum</i>
JM272	CaMV35S	35S::35S::ASAL nativo:: <i>nos-t</i>	<i>Allium ampeloprasum</i>

JM274	CaMV35S	35S::35S::ASAL corto::nos-t	<i>Allium roseum</i>
JM282	CaMV35S	35S::35S::HtA corto::ACA corto::ASAL corto::nos-t	<i>Hirsutella</i> , <i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i> , <i>Allium</i> <i>tuberosum</i>
JM283	CaMV35S	35S::35S::ACA corto::ASAL corto::nos-t	<i>Allium tuberosum</i> , <i>Allium roseum</i>
JM210	CaMV35S	35S::35S::GUS::nos-t	
JM206	Shpx6b	Shpx6b::nos-t	
JM221	Shpx6b	Shpx6b::HtA corto::nos-t	<i>Hirsutella</i>
JM264	Shpx6b	Shpx6b::HtA corto::ACA corto::ASAL corto::nos-t	<i>Hirsutella</i> , <i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i> , <i>Allium</i> <i>tuberosum</i>
JM285	Shpx6b	Shpx6b::ACA corto::ASAL corto::nos-t	<i>Allium tuberosum</i> , <i>Allium roseum</i>

Tabla 2. Constructos adicionales

Nombre de Constructo	Promotor	Contenidos de casetes	Fuente de origen de genes expresados
EK101	Sus1	Sus1::HtA corto::ACA corto::ASAL corto::nos-t	<i>Prunus domestica</i> , <i>Hirsutella</i> , <i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i> , <i>Allium</i> <i>tuberosum</i>
EK102	Sus1	Sus1::MpNPR1::nos-t	<i>Prunus domestica</i> , <i>Malus x domestica</i>
EK103	Sus1	Sus1::CsNPR1::nos-t	<i>Prunus domestica</i> , <i>Citrus sinensis</i>
EK104	CsSUS1	CsSUS1::HtA corto::ACA corto::ASAL corto::nos-t	<i>Citrus sinensis</i> , <i>Hirsutella</i> , <i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i> , <i>Allium</i> <i>tuberosum</i>
EK105	CsSUS1	CsSUS1::MpNPR1::nos-t	<i>Citrus sinensis</i> , <i>Malus x</i> <i>domestica</i>
EK106	CsSUS1	CsSUS1::CsNPR1::nos-t	<i>Citrus sinensis</i>

Ejemplo 2

- 5 Las plantas de tomate transgénicas se obtuvieron por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de acuerdo con métodos estándar que usan los constructos de expresión de plantas descritos en el Ejemplo 1.

Se bio-ensayaron las plantas transgénicas por el atractivo a los psílicos de tomate, *B. cockerelli*, ubicándolos en pequeñas cámaras que contienen hojas transgénicas y no transformadas de control. Aquellas plantas en cuyas hojas los psílicos no permanecieron se identificaron como menos atractivas para los psílicos, y por lo tanto menos probables ser probadas por las probóscides de alimentación de los psílicos. Un ensayo típico implica la preparación de una cámara que contiene hojas de control y de tomate transgénico e introducción de aproximadamente 5 psílicos en la cámara. De dieciocho a veinticuatro horas después de configurar el ensayo, la localización de los psílicos se controla contando el número de psílicos en una hoja transgénica en comparación con el número en las hojas de control. Las líneas de plantas transgénicas se toman como útiles cuando se encuentran 0 o 1 psílicos en hojas transgénicas, con un mayor número de psílicos encontrados en las hojas de control.

En algunos experimentos, pero no en todos, las hojas transgénicas eran menos atractivas para los psílicos que las hojas de control. La Tabla 3 a continuación muestra resultados seleccionados de líneas transgénicas identificadas como menos atractivas para psílicos.

Tabla 3

Constructo	Promotor	Gen	Fuente	# de Líneas transgénicas	# de Líneas no atractivas	% de Líneas no atractivas
204	35S	Hta corto	<i>Hirsutella</i>	12	4	33
221	Shpx6b	Hta corto	<i>Hirsutella</i>	8	4	50
Total		Hta corto	<i>Hirsutella</i>	20	8	40
272	35S	ASAL A largo	<i>Allium ampeloprasum</i>	27	3	11
274	35S	ASAL R corto	<i>Allium roseum</i>	20	3	15
277	35S	ACA corto	<i>Allium cepa aggregatum</i>	86	14	16
278	35S	ACT corto	<i>Allium tuberosum</i>	49	7	14
282	35S	Hta-ACA-ASAL R	<i>Hirsutella</i> , <i>Allium cepa aggregatum</i> , y <i>Allium roseum</i>	34	5	15
283	35S	ACA-ASAL R	<i>Allium cepa aggregatum</i> y <i>Allium roseum</i>	35	9	26

NPR1	35S	MpNP R1	Manzana	22	5	23
------	-----	------------	---------	----	---	----

El gen Hta del hongo de *Hirsutella* fue más efectivo en el tomate en la disuasión psílidos de alimentación. La construcción apilada con dos genes de aglutinina de *Allium* (ACA-ASALR) fue efectivo para disuadir la alimentación de psílidos también.

5 Ejemplo 3 – Prevención de verdeado cítrico

Se causa el verdeado de los cítricos (Huanglongbing, HLB) por una bacteria con paredes limitadas de floema, *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Se vectoriza HLB por los psílidos cítricos asiáticos (*Diaphorina citri*). Los bioensayos de plantas de tomate que se han transformado con varios genes del hongo de *Hirsutella* que coloniza insectos y de las especies *Allium* (la familia de la cebolla) evidenciaron que la incorporación de estos genes en líneas transgénicas inhibía la alimentación por insectos psílidos. Los constructos que representan las plantas de tomates "no atractivas" a los psílidos de tomate se prueban a continuación en plantas de naranjas para determinar si tales constructos hacen que las plantas de naranjas no sean atractivas para los psílidos de cítricos asiáticos, y por lo tanto, podrían interferir con la transmisión de la bacteria que causa HLB.

Las plantas de naranja dulce 'Hamlin' transgénica (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) se obtienen por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de acuerdo con métodos estándar que usan los constructos de expresión de plantas descritos en el Ejemplo 1. Los constructos JM204, JM277 y JM282 son especialmente útiles en la invención.

En particular, se han generado plantas de Hamlin transgénicas usando constructos JM277 (ACA corto) y JM282 (Hta-ACA-ASALR).

Las plantas transgénicas de Hamlin son identificadas y bio-ensayadas en la capacidad de atraer a los psílidos de cítricos asiáticos mediante la ubicación de psílidos en pequeñas cámaras que contienen hojas transgénicas y de control no transformadas (por ejemplo, hojas juveniles) como se describe en el Ejemplo 2. Aquellas plantas en cuyas hojas los psílidos no permanecen se identifican como menos atractivos para los psílidos como se describió en el Ejemplo 2, y por lo tanto menos probables de ser probadas por las probóscides de alimentación de psílidos. Tales plantas cítricas transgénicas no atractivas se toman como útiles en la invención.

30 Ejemplo 4 - Prevención de los psílidos amarillos y la enfermedad de la viruela cebrada en patatas

La enfermedad de la viruela cebrada en las patatas se piensa para ser causada por *Liberibacter solanacearum*, vectorizada por *B. cockerelli*, los psílidos de patata/tomate. Los psílidos amarillos es una enfermedad de patata que se cree que es causada por una toxina producida por la etapa de la ninfa de los psílidos de patata/tomate. Los bioensayos de plantas de tomate que se han transformado con varios genes del hongo de *Hirsutella* que coloniza insectos y de las especies *Allium* (la familia de la cebolla) evidenciaron que la incorporación de estos genes inhibía la alimentación por insectos psílidos. Se plantea la hipótesis de que la "no capacidad de atraer" de estas plantas de tomate transformadas a *B. cockerelli* sugieren que la transformación de los mismos genes en las plantas de patata reducirá la alimentación de los psílidos y por lo tanto, interferir con la transmisión de *Liberibacter solanacearum*, a causa de la enfermedad de la viruela de la cebrada, y la toxina que induce psílidos amarillos.

Se obtienen las plantas de patata transgénica (*Solanum tuberosum* L.) por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de acuerdo con métodos estándar que usan los

constructos de expresión de plantas descritas en el Ejemplo 1. Se prevé que los constructos JM204, JM277 y JM282 son especialmente útiles en la invención.

- 5 Las plantas de patata transgénicas son identificadas y bio-ensayadas por no atraer a *B. cockerelli* que ubican los insectos en pequeñas cámaras que contienen hojas transgénicas y no transformadas de control como se describió en el Ejemplo 2. Aquellas plantas en cuyas hojas los psílidos no permanecen, son identificadas como menos atractivas a los psílidos como se describió en el Ejemplo 2 y, por lo tanto es menos probable que sea probada por las probóscides de alimentación de los psílidos y para ser los receptores de bacterias y toxinas. Se toman tales plantas transgénicas no atractivas como útiles en la invención.
- 10 Puesto que pueden realizarse diversas modificaciones en las construcciones y métodos descritos e ilustrados aquí sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que todo el componente contenido en la descripción anterior se debe interpretar como ilustrativo en vez de limitante. Por lo tanto, la amplitud y el alcance de la presente invención no deberían estar limitados por ninguna de las realizaciones a manera de ejemplo descritas anteriormente,
- 15 sino que deberían definirse únicamente de acuerdo con las siguientes reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

TEXTO LIBRE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

A continuación se aporta una traducción del texto libre en inglés que aparece en la lista de secuencias.

- 20 Artificial Sequence: Secuencia artificial.
- Synthetic Primer: Cebador sintético.

REIVINDICACIONES

1. Una planta que comprende un transgén que codifica un polipéptido heterólogo que confiere en dicha planta la expresión de dicha resistencia de polipéptidos a un insecto hemipteroide que succionan la savia,
- 5 en la que dicha planta comprende uno o más de un gen de ribotoxina, un gen de lectina, o un gen regulador implicado en la resistencia basal de la planta,
en la que dicho gen de ribotoxina es sustancialmente idéntico a Hirsutellin A ("HtA") nativa (SEQ ID NO: 1) o Hta "corto" (SEQ ID NO: 3),
en la que dicho gen de lectina es sustancialmente idéntico a ASAL "nativo" (SEQ ID NO: 5),- 10 ASALR nativo (SEQ ID NO: 7), ASALR corto (SEQ ID NO: 9), ACA nativo (SEQ ID NO: 11), ACA corto (SEQ ID NO: 13), ACT nativo (SEQ ID NO: 15), o ACT corto (SEQ ID NO: 17),
en la que dicho gen regulador es sustancialmente idéntico a MpNPR1 (SEQ ID NO: 19) o CsNPR1.
- 15 2. La planta de la reivindicación 1, en la que dicho transgén se expresa en un componente vegetal.
- 3. La planta de la reivindicación 2, en la que dicho componente vegetal es una hoja.
- 4. La planta de la reivindicación 1, en la que dicho insecto es un psílido.
- 5. La planta de la reivindicación 4, en la que dicho psílido es el psílido cítrico asiático, el psílido cítrico asiático, el psílido cítrico asiático.
- 20 6. La planta de la reivindicación 1, en la que dicha planta es una planta cítrica o una planta solanácea.
- 7. La planta de la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido es sustancialmente idéntico a HtA (nativo) (SEQ ID NO: 2), HtA (corto) (SEQ ID NO: 4), ASAL (nativo) (SEQ ID NO: 6), ASALR (nativo) (SEQ ID NO: 8), ASALR (corto) (SEQ ID NO: 10), ACA (nativo) (SEQ ID NO: 12), ACA (corto) (SEQ ID NO: 14), ACT (nativo) (SEQ ID NO: 16), ACT (corto) (SEQ ID NO: 18), MpNPR1 (SEQ ID NO: 20) o CsNPR1.
- 25 8. La planta de la reivindicación 7, en la que los polinucleótidos que codifican los polipéptidos están apilados.
- 9. Un producto derivado de la planta de la reivindicación 1, en la que dicho producto comprende una cantidad detectable de dicho transgén o dicho polipéptido o un gen de resistencia a herbicidas o ambos
- 30 10. El producto de la reivindicación 9, en la que dicho producto es un producto cítrico, un producto de patata o un producto de tomate.
- 11. Una planta de la reivindicación 1, que comprende además un gen de resistencia a herbicidas que confiere resistencia a un herbicida.
- 35 12. Un polinucleótido que tiene identidad sustancial con HtA (nativo), HtA (corto), ASAL (nativo), ASALR (nativo), ASALR (corto), ACA (nativo), ACA (corto), ACT (nativo), ACT (corto), MpNPR1, o CsNPR1 opcionalmente en el que dicho polinucleótido está operativamente vinculado a una secuencia regulatoria heteróloga, y en el que dichas secuencias regulatorias comprenden un promotor.
- 40

13. El polinucleótido de la reivindicación 12, en la que dicho polinucleótido es complementario de al menos 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo de HtA (nativo), HtA (corto), ASAL (nativo), ASALR (nativo), ASALR (corto), ACA (nativo), ACA (corto), ACT (nativo), ACT (corto), MpNPR1, o CsNPR1 o sustancialmente idéntico a cualquiera de los polinucleótidos anteriormente mencionados.
14. Un constructo de polinucleótido que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 12-13.
15. El constructo de polinucleótido de la reivindicación 14, en el que dicho polinucleótido se expresa en el tejido de floema de una planta.
16. Una célula vegetal o un componente vegetal que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 12 - 15.
17. Una célula bacteriana que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 12 - 15.
18. Una planta transformada de forma estable con el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 12 - 15.
19. Un componente vegetal o una semilla de la planta de la reivindicación 18, en el que dicho componente vegetal o semilla comprende dicho polinucleótido.
20. Una progenie o un componente vegetal de la planta de la reivindicación 18, donde dicha progenie comprende dicho polinucleótido.
21. La planta de la reivindicación 18, en la que dicha planta es una planta cítrica o solanácea.
22. Un método para hacer una planta resistente al verdeado de los cítricos, que comprende introducir en una célula vegetal el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 12 - 15; regenerar a partir de dicha célula vegetal una planta transgénica que expresa una cantidad inhibidora de insecto de un polipéptido codificado por dicho polinucleótido; y demostrar la resistencia a psílidos cítricos asiáticos como una propiedad de dicha planta transgénica.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Cornell University
 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ALIMENTACIÓN POR PSÍLIDOS
 <130> 50341-025W02
 <150> US 62/008,934
 <151> 2014-06-06
 <160> 41
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> *Hirsutella thompsonii*

<400> 1
 atgaaggcct ttactgccat tctcgccagc gcggccttgt tcgccaccgg cctcgcggt 60
 cccgcctcag aagccacctc ggtgaacagc ctggaagagc gcgctcccat cgtcacctgc 120
 cggcccaagc tcgacgggcg ggagaagccg ttcaaggtag acgtggcgac ggcgcaggca 180
 caggcgcgca aggcgggcct gacgacgggc aagagcggcg accctcaccg gtacttcgcc 240
 ggcgaccaca tccgctgggg cgtcaacaac tgcgacaagg cggacgcgat cctgtgggag 300
 taccgatct actgggtcgg caagaacgcc gagtgggcca aggacgtcaa gacgtcgag 360
 caaaagggag ggccgacgcc gatccgcgtc gtctacgcca acagcagggg cgccgtgcag 420
 tactgcggcg tcatgacgca cagcaaggtc gacaagaata accagggcaa ggagttcttt 480
 gagaagtgcg attag 495

<210> 2
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> *Hirsutella thompsonii*

<400> 2

Met Lys Ala Phe Thr Ala Ile Leu Ala Ser Ala Ala Leu Phe Ala Thr
 1 5 10 15

Gly Leu Ala Ala Pro Ala Ser Glu Ala Thr Ser Val Asn Ser Leu Glu
 20 25 30

Glu Arg Ala Pro Ile Val Thr Cys Arg Pro Lys Leu Asp Gly Arg Glu
 35 40 45

Lys Pro Phe Lys Val Asp Val Ala Thr Ala Gln Ala Gln Ala Arg Lys
 50 55 60

Ala Gly Leu Thr Thr Gly Lys Ser Gly Asp Pro His Arg Tyr Phe Ala
 65 70 75 80

Gly Asp His Ile Arg Trp Gly Val Asn Asn Cys Asp Lys Ala Asp Ala
 85 90 95

ES 2 627 863 A2

Ile Leu Trp Glu Tyr Pro Ile Tyr Trp Val Gly Lys Asn Ala Glu Trp
100 105 110

Ala Lys Asp Val Lys Thr Ser Gln Gln Lys Gly Gly Pro Thr Pro Ile
115 120 125

Arg Val Val Tyr Ala Asn Ser Arg Gly Ala Val Gln Tyr Cys Gly Val
130 135 140

Met Thr His Ser Lys Val Asp Lys Asn Asn Gln Gly Lys Glu Phe Phe
145 150 155 160

Glu Lys Cys Asp

<210> 3
<211> 396
<212> DNA
<213> Hirsutella thompsonii

<400> 3
atggctccca tcgtcacctg ccggcccaag ctcgacgggc gggagaagcc gttcaaggta 60
gacgtggcga cggcgcaggc acaggcgcg c aaggcggg cc tgacgacggg caagagcggc 120
gacctcacc ggtacttcgc cggcgaccac atccgctggg gcgtcaacaa ctgcgacaag 180
gcggacgca tcctgtggga gtacccgatc tactgggtcg gcaagaacgc cgagtgggcc 240
aaggacgtca agacgtcgca gcaaaaggga gggccgacgc cgatccgcgt cgtctacgcc 300
aacagcaggg gcgccgtgca gtactgcggc gtcatgacgc acagcaaggt cgacaagaat 360
aaccagggca aggagttctt tgagaagtgc gattag 396

<210> 4
<211> 131
<212> PRT
<213> Hirsutella thompsonii

<400> 4

Met Ala Pro Ile Val Thr Cys Arg Pro Lys Leu Asp Gly Arg Glu Lys
1 5 10 15

Pro Phe Lys Val Asp Val Ala Thr Ala Gln Ala Gln Ala Arg Lys Ala
20 25 30

Gly Leu Thr Thr Gly Lys Ser Gly Asp Pro His Arg Tyr Phe Ala Gly
35 40 45

Asp His Ile Arg Trp Gly Val Asn Asn Cys Asp Lys Ala Asp Ala Ile
50 55 60

Leu Trp Glu Tyr Pro Ile Tyr Trp Val Gly Lys Asn Ala Glu Trp Ala
65 70 75 80

ES 2 627 863 A2

Lys Asp Val Lys Thr Ser Gln Gln Lys Gly Gly Pro Thr Pro Ile Arg
85 90 95

Val Val Tyr Ala Asn Ser Arg Gly Ala Val Gln Tyr Cys Gly Val Met
100 105 110

Thr His Ser Lys Val Asp Lys Asn Asn Gln Gly Lys Glu Phe Phe Glu
115 120 125

Lys Cys Asp
130

<210> 5
<211> 513
<212> DNA
<213> Allium ampeloprasum

<400> 5
atgagcgtgg ccactgtagc caccatccta accattttgg catctacatg catggccaga 60
aacgtattgg tgaacaacga aggactgtac gcaggccaat ccctagtcga ggaacagtac 120
acttttataa tgcaggatga ctgcaacctt gtactgtatg aatacagcac ccccatctgg 180
gcctcaaaca caggcatcac cggtaaaaat ggggtgcaggg ccgtgatgca gcctgatggc 240
aactttgtcg tctacgatgt taaggggctg gccgtctggg ccagtaacag cagaagaggg 300
aacgggaact atatcctggg gcttcagaag gacagaaacg ttgttattta cggatctgat 360
atttgggtcta ctggcacata ccggaaaaaa gtgggtggaa ctgttggttat ggctatgagt 420
ggtagcgtcg atggaggctc cgcgattgga ccgtaacag tgaatcagaa tgtcactgcc 480
gtccgaaagg ttgcagcagc tgctgctgct tga 513

<210> 6
<211> 170
<212> PRT
<213> Allium ampeloprasum

<400> 6

Met Ser Val Ala Thr Val Ala Thr Ile Leu Thr Ile Leu Ala Ser Thr
1 5 10 15

Cys Met Ala Arg Asn Val Leu Val Asn Asn Glu Gly Leu Tyr Ala Gly
20 25 30

Gln Ser Leu Val Glu Glu Gln Tyr Thr Phe Ile Met Gln Asp Asp Cys
35 40 45

Asn Leu Val Leu Tyr Glu Tyr Ser Thr Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr
50 55 60

Gly Ile Thr Gly Lys Asn Gly Cys Arg Ala Val Met Gln Pro Asp Gly
65 70 75 80

ES 2 627 863 A2

Asn Phe Val Val Tyr Asp Val Lys Gly Arg Ala Val Trp Ala Ser Asn
85 90 95

Ser Arg Arg Gly Asn Gly Asn Tyr Ile Leu Val Leu Gln Lys Asp Arg
100 105 110

Asn Val Val Ile Tyr Gly Ser Asp Ile Trp Ser Thr Gly Thr Tyr Arg
115 120 125

Lys Lys Val Gly Gly Thr Val Val Met Ala Met Ser Gly Thr Val Asp
130 135 140

Gly Gly Ser Ala Ile Gly Pro Val Thr Val Asn Gln Asn Val Thr Ala
145 150 155 160

Val Arg Lys Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala
165 170

<210> 7
<211> 513
<212> DNA
<213> Allium roseum

<400> 7
atgagcgtgg ccactgtagc caccatccta accattttgg catctacatg catggccaga 60
aacgtattgg tgaacaacga aggactgtac gcaggccaat ccctagtcga ggaacagtac 120
acttttataa tgcaggatga ctgcaacctt gtactgtatg aatacagcac ccccatctgg 180
gcctcaaaca cgggcatcac cggtaaaaat ggggtgcaggg ccgtgatgca gcctgatggc 240
aactttgtcg tctacgatgt taaggggctg gccgtctggg ccagtaacag cagaagaggg 300
aacgggaact atatcctggg gcttcagaag gacagaaacg ttgttattta cggatctgat 360
atttgggtcta ctggcacata ccggaaaaaa gtgggtggaa ctgttggttat ggctatgaat 420
ggtagcggctg atggaggctc cgcgattgga ccggtaacag tgaatcagaa tgctactgcc 480
gtccgaaagg ttgcagcagc tgctgctgct tga 513

<210> 8
<211> 170
<212> PRT
<213> Allium roseum

<400> 8
Met Ser Val Ala Thr Val Ala Thr Ile Leu Thr Ile Leu Ala Ser Thr
1 5 10 15

Cys Met Ala Arg Asn Val Leu Val Asn Asn Glu Gly Leu Tyr Ala Gly
20 25 30

Gln Ser Leu Val Glu Glu Gln Tyr Thr Phe Ile Met Gln Asp Asp Cys
35 40 45

Asn Leu Val Leu Tyr Glu Tyr Ser Thr Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr

ES 2 627 863 A2

50

55

60

Gly Ile Thr Gly Lys Asn Gly Cys Arg Ala Val Met Gln Pro Asp Gly
65 70 75 80

Asn Phe Val Val Tyr Asp Val Lys Gly Arg Ala Val Trp Ala Ser Asn
85 90 95

Ser Arg Arg Gly Asn Gly Asn Tyr Ile Leu Val Leu Gln Lys Asp Arg
100 105 110

Asn Val Val Ile Tyr Gly Ser Asp Ile Trp Ser Thr Gly Thr Tyr Arg
115 120 125

Lys Lys Val Gly Gly Thr Val Val Met Ala Met Asn Gly Thr Val Asp
130 135 140

Gly Gly Ser Ala Ile Gly Pro Val Thr Val Asn Gln Asn Val Thr Ala
145 150 155 160

Val Arg Lys Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala
165 170

<210> 9
<211> 336
<212> DNA
<213> Allium roseum

<400> 9
atgaggaacc tactgacgaa cggcgaagga ctgtatgcag ggcaatccct agatgtagaa 60
cagtacaagt ttataatgca ggatgactgc aacctcgat tgtacgaata cagcaccccc 120
atctgggcct caaacaccgg tgtcactggc aaaaacgggt gcagggctgt catgcaaaag 180
gacggcaact ttgtggtcta cgatgttaac gggcgtcccg tctgggccag taacagtgt 240
agaggggaatg ggaactatat cctggtgctt caggaggaca ggaacgttgt catttacggc 300
tctgatattt ggtctactgg tacctacaga agatga 336

<210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> Allium roseum

<400> 10

Met Leu Arg Asn Leu Leu Thr Asn Gly Glu Gly Leu Tyr Ala Gly Gln
1 5 10 15

Ser Leu Asp Val Glu Gln Tyr Lys Phe Ile Met Gln Asp Asp Cys Asn
20 25 30

Leu Val Leu Tyr Glu Tyr Ser Thr Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly
35 40 45

ES 2 627 863 A2

Val Thr Gly Lys Asn Gly Cys Arg Ala Val Met Gln Lys Asp Gly Asn
50 55 60

Phe Val Val Tyr Asp Val Asn Gly Arg Pro Val Trp Ala Ser Asn Ser
65 70 75 80

Val Arg Gly Asn Gly Asn Tyr Ile Leu Val Leu Gln Glu Asp Arg Asn
85 90 95

Val Val Ile Tyr Gly Ser Asp Ile Trp Ser Thr Gly Thr Tyr Arg Arg
100 105 110

<210> 11
<211> 513
<212> DNA
<213> Allium cepa

<400> 11
atgagcgtgg ccactgtagc caccatccta accattttgg catctacatg catggccaga 60
aacgtattgg tgaacaacga aggactgtac gcaggccaat ccctagtcga ggaacagtac 120
acttttataa tgcaggatga ctgcaacctt gtactgtatg aatacagcac ccccatctgg 180
gcctcaaaca cgggcatcac cggtaaaaat ggggtgcaggg ccgtgatgca gcctgatggc 240
aactttgtcg tctacgatgt taaggggctg gccgtctggg ccagtaacag cagaagaggg 300
aacgggaact atatcctggt gcttcagaag gacagaaacg ttgttattta cggatctgat 360
atttggtcta ctggcacata ccggaaaaaa gtgggtggaa ctgttggttat ggctatgaat 420
ggtagcgtcg atggaggctc cgcgattgga ccggtaacag tgaatcagaa tgtcactgcc 480
gtccgaaagg ttgcagcagc tgctgctgct tga 513

<210> 12
<211> 170
<212> PRT
<213> Allium cepa

<400> 12

Met Ser Val Ala Thr Val Ala Thr Ile Leu Thr Ile Leu Ala Ser Thr
1 5 10 15

Cys Met Ala Arg Asn Val Leu Val Asn Asn Glu Gly Leu Tyr Ala Gly
20 25 30

Gln Ser Leu Val Glu Glu Gln Tyr Thr Phe Ile Met Gln Asp Asp Cys
35 40 45

Asn Leu Val Leu Tyr Glu Tyr Ser Thr Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr
50 55 60

Gly Ile Thr Gly Lys Asn Gly Cys Arg Ala Val Met Gln Pro Asp Gly
65 70 75 80

Asn Phe Val Val Tyr Asp Val Lys Gly Arg Ala Val Trp Ala Ser Asn

ES 2 627 863 A2

85

90

95

Ser Arg Arg Gly Asn Gly Asn Tyr Ile Leu Val Leu Gln Lys Asp Arg
100 105 110

Asn Val Val Ile Tyr Gly Ser Asp Ile Trp Ser Thr Gly Thr Tyr Arg
115 120 125

Lys Lys Val Gly Gly Thr Val Val Met Ala Met Asn Gly Thr Val Asp
130 135 140

Gly Gly Ser Ala Ile Gly Pro Val Thr Val Asn Gln Asn Val Thr Ala
145 150 155 160

Val Arg Lys Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala
165 170

<210> 13
<211> 336
<212> DNA
<213> Allium cepa

<400> 13
atgagaaacg tattggtgaa caacgaagga ctgtacgcag gccaatccct agtcgaggaa 60
cagtacactt ttataatgca ggatgactgc aaccttgtac tgtatgaata cagcaccccc 120
atctgggcct caaacacggg catcaccggg aaaaatgggt gcagggccgt gatgcagcct 180
gatggcaact ttgtcgtcta cgatgttaag gggcgtgccg tctgggccag taacagcaga 240
agaggggaacg ggaactatat cctggtgctt cagaaggaca gaaacgttgt tatttacgga 300
tctgatattt ggtctactgg tacgtacagg aaatga 336

<210> 14
<211> 111
<212> PRT
<213> Allium cepa

<400> 14

Met Arg Asn Val Leu Val Asn Asn Glu Gly Leu Tyr Ala Gly Gln Ser
1 5 10 15

Leu Val Glu Glu Gln Tyr Thr Phe Ile Met Gln Asp Asp Cys Asn Leu
20 25 30

Val Leu Tyr Glu Tyr Ser Thr Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Ile
35 40 45

Thr Gly Lys Asn Gly Cys Arg Ala Val Met Gln Pro Asp Gly Asn Phe
50 55 60

Val Val Tyr Asp Val Lys Gly Arg Ala Val Trp Ala Ser Asn Ser Arg
65 70 75 80

ES 2 627 863 A2

Arg Gly Asn Gly Asn Tyr Ile Leu Val Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val
85 90 95

Val Ile Tyr Gly Ser Asp Ile Trp Ser Thr Gly Thr Tyr Arg Lys
100 105 110

<210> 15
<211> 513
<212> DNA
<213> Allium tuberosum

<400> 15
atgagcgtgg ccactgtagc caccatccta accattttgg catctacatg catggccaga 60
aacgtattgg tgaacaacga aggactgtac gcaggccaat ccctagtcga ggaacagtac 120
acttttataa tgcaggatga ctgcaacctt gtactgtatg aatacagcac ccccatctgg 180
gcctcaaaca caggcatcac cggtaaaaat ggggtgcaggg ccgtgatgca gcctgatggc 240
aactttgtcg tctacgatgt taaggggctg gccgtctggg ccagtaacag cagaagaggg 300
aacgggaact atatcctggg gcttcagaag gacagaaacg ttgttattta cggatctgat 360
atttgggtcta ctggcacata ccggaaaaaa gtgggtggaa ctgttggttat ggctatgagt 420
ggtagggtcg atggaggctc cgcgattgga ccggtaacag tgaatcagaa tgctactgcc 480
gtccgaaagg ttgcagcagc tgctgctgct tga 513

<210> 16
<211> 170
<212> PRT
<213> Allium tuberosum

<400> 16

Met Ser Val Ala Thr Val Ala Thr Ile Leu Thr Ile Leu Ala Ser Thr
1 5 10 15

Cys Met Ala Arg Asn Val Leu Val Asn Asn Glu Gly Leu Tyr Ala Gly
20 25 30

Gln Ser Leu Val Glu Glu Gln Tyr Thr Phe Ile Met Gln Asp Asp Cys
35 40 45

Asn Leu Val Leu Tyr Glu Tyr Ser Thr Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr
50 55 60

Gly Ile Thr Gly Lys Asn Gly Cys Arg Ala Val Met Gln Pro Asp Gly
65 70 75 80

Asn Phe Val Val Tyr Asp Val Lys Gly Arg Ala Val Trp Ala Ser Asn
85 90 95

Ser Arg Arg Gly Asn Gly Asn Tyr Ile Leu Val Leu Gln Lys Asp Arg
100 105 110

Asn Val Val Ile Tyr Gly Ser Asp Ile Trp Ser Thr Gly Thr Tyr Arg

ES 2 627 863 A2

115

120

125

Lys Lys Val Gly Gly Thr Val Val Met Ala Met Ser Gly Thr Val Asp
130 135 140

Gly Gly Ser Ala Ile Gly Pro Val Thr Val Asn Gln Asn Val Thr Ala
145 150 155 160

Val Arg Lys Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala
165 170

<210> 17
<211> 336
<212> DNA
<213> Allium tuberosum

<400> 17
atgagaaacg tattggtgaa caacgaagga ctgtacgcag gccaatccct agtcgaggaa 60
cagtacactt ttataatgca ggatgactgc aaccttgtac tgtatgaata cagcaccccc 120
atctgggcct caaacacagg catcaccggt aaaaatgggt gcagggccgt gatgcagcct 180
gatggcaact ttgtcgtcta cgatgttaag gggcgtgccg tctgggccag taacagcaga 240
agagggaaacg ggaactatat cctggtgctt cagaaggaca gaaacgttgt tatttacgga 300
tctgatattt ggtctactgg tacgtacagg aaatga 336

<210> 18
<211> 111
<212> PRT
<213> Allium tuberosum

<400> 18
Met Arg Asn Val Leu Val Asn Asn Glu Gly Leu Tyr Ala Gly Gln Ser
1 5 10 15

Leu Val Glu Glu Gln Tyr Thr Phe Ile Met Gln Asp Asp Cys Asn Leu
20 25 30

Val Leu Tyr Glu Tyr Ser Thr Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Ile
35 40 45

Thr Gly Lys Asn Gly Cys Arg Ala Val Met Gln Pro Asp Gly Asn Phe
50 55 60

Val Val Tyr Asp Val Lys Gly Arg Ala Val Trp Ala Ser Asn Ser Arg
65 70 75 80

Arg Gly Asn Gly Asn Tyr Ile Leu Val Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val
85 90 95

Val Ile Tyr Gly Ser Asp Ile Trp Ser Thr Gly Thr Tyr Arg Lys
100 105 110

ES 2 627 863 A2

<210> 19
 <211> 1761
 <212> DNA
 <213> Malus domestica

<400> 19
 atggctcatt cagccgaacc atcatcctct ctgagcttta cttcatcacc ccatttatca 60
 aatggttcaa taagccacaa cttatcgtgt tctggctccg aatcggtgcc aagtcttgaa 120
 gtcacagtt tgtccaagct tagctctagt ttggagcagt tgttgattga tcctggctgt 180
 gactatagt atgctgatat cgtagttgag gggattcctg ttggtgtaca ccgatgtata 240
 ttggcttcta ggagtggatt ttttcgagag ctattcaagc gagaaaaggg gtcttctgga 300
 aaggaagaca ggccaaagta ctgtatgagt gatcttctgc cttatggcga tgttgatat 360
 gaagccttct tggttttctt aagctatgtg tatactggaa agcttaagcc ttctcccgtg 420
 gaggtgtcaa cctgcgttca caatgtatgt gcccatgacg catgtagacc tgctatcaat 480
 ttcgttgtgg aattgatgta cgccgcttcc attttccaaa tgcccgatct ggtttcgata 540
 ttcgagcggc gccttcttaa ttttggtggg aaagctctgt cagacaatgt tgtcccaatt 600
 ctcttggttg ccttccattg tcagttgaat cagctcatcg atcagtgtgt agatagagt 660
 gcacgatcag atattgatga catctctctt gagaaggacg ttcctgatga ggttgtgaag 720
 aaaatcaaaa ttcttcgccg caattatcag caggattctg acccaaactt gccacctgcc 780
 gatcccttgc atgaaaagag aatccgaaga atacataagg ctttggtgactc ggatgatgtc 840
 gagcttgtga aacttctttt aacggagtct aatataacct tagatgaagc caatgctctc 900
 cattatgctg cagcttactg cgatcctaag gttgtgaccg aagtgccttgc tctgggcctc 960
 gctgatgtta acctccggaa ttctaggggt tatacagtgc ttcacattgc tgtgatgcgc 1020
 aaagagccat caattattgt attgctactg actaaaggag ctcgtgcacg ggagctgaca 1080
 tcagatgggtc agagtgtgt tagtatttgc aggaggttga cgagaccaa ggattaccat 1140
 tcaaaaacag agcaggggca agaagcaaac aaagaccgaa tatgcatcga tgttctagag 1200
 agggaaatgc ggcggaatcc aatggctgga gatgcatcta tatcttcca aataatgccc 1260
 gatgatctgc acatggagtt gctgaacctg gagaacagag tggcattggc ccgattgttt 1320
 ttccctgcgg aagccaagct agccatggc attgcccattg cggagacatc tgagtttgc 1380
 gcgccatcat catcgaaagg atcaagtggg aatctgatgg aggtagattt aaacgagacc 1440
 cccacctgac agaacaaaag acttcattcc aggttggaag cccttatgaa aacagtccgt 1500
 ttgggttagat gctacttccc tcattgctca gaagtcctgg ataagttcat cgatgacgac 1560
 ctccctcatt tgttttacct cgagcctggc tcctccgacg agcagaagggt aaagaggagg 1620
 cgtttcatgg agctcaagga ggaagtacaa aaagcatttg acaaggacaa ggccgagtgt 1680
 aacctctccg gattgtcttc atcgtcctcc acgacatctc cggaaaaaat tggtgcaaat 1740
 cagaagggtta gggaaccgtg a 1761

<210> 20
 <211> 586

ES 2 627 863 A2

<212> PRT
<213> Malus domestica

<400> 20

Met Ala His Ser Ala Glu Pro Ser Ser Ser Leu Ser Phe Thr Ser Ser
1 5 10 15

Pro His Leu Ser Asn Gly Ser Ile Ser His Asn Leu Ser Cys Ser Gly
20 25 30

Ser Glu Ser Val Pro Ser Leu Glu Val Ile Ser Leu Ser Lys Leu Ser
35 40 45

Ser Ser Leu Glu Gln Leu Leu Ile Asp Pro Gly Cys Asp Tyr Ser Asp
50 55 60

Ala Asp Ile Val Val Glu Gly Ile Pro Val Gly Val His Arg Cys Ile
65 70 75 80

Leu Ala Ser Arg Ser Gly Phe Phe Arg Glu Leu Phe Lys Arg Glu Lys
85 90 95

Gly Ser Ser Gly Lys Glu Asp Arg Pro Lys Tyr Cys Met Ser Asp Phe
100 105 110

Leu Pro Tyr Gly Asp Val Gly Tyr Glu Ala Phe Leu Val Phe Leu Ser
115 120 125

Tyr Val Tyr Thr Gly Lys Leu Lys Pro Ser Pro Val Glu Val Ser Thr
130 135 140

Cys Val His Asn Val Cys Ala His Asp Ala Cys Arg Pro Ala Ile Asn
145 150 155 160

Phe Val Val Glu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Ile Phe Gln Met Pro Asp
165 170 175

Leu Val Ser Ile Phe Glu Arg Arg Leu Leu Asn Phe Val Gly Lys Ala
180 185 190

Leu Ser Asp Asn Val Val Pro Ile Leu Leu Val Ala Phe His Cys Gln
195 200 205

Leu Asn Gln Leu Ile Asp Gln Cys Val Asp Arg Val Ala Arg Ser Asp
210 215 220

Ile Asp Asp Ile Ser Leu Glu Lys Gly Leu Pro Asp Glu Val Val Lys
225 230 235 240

Lys Ile Lys Ile Leu Arg Arg Asn Tyr Gln Gln Asp Ser Asp Pro Asn
245 250 255

ES 2 627 863 A2

Leu Pro Pro Ala₂₆₀ Asp Pro Leu His Glu₂₆₅ Lys Arg Ile Arg Arg₂₇₀ Ile His
 Lys Ala Leu₂₇₅ Asp Ser Asp Asp Val₂₈₀ Glu Leu Val Lys Leu₂₈₅ Leu Leu Thr
 Glu Ser₂₉₀ Asn Ile Thr Leu Asp₂₉₅ Glu Ala Asn Ala Leu₃₀₀ His Tyr Ala Ala
 Ala Tyr Cys Asp Pro Lys₃₁₀ Val Val Thr Glu Val₃₁₅ Leu Ala Leu Gly Leu₃₂₀
 Ala Asp Val Asn₃₂₅ Leu Arg Asn Ser Arg Gly₃₃₀ Tyr Thr Val Leu His₃₃₅ Ile
 Ala Val Met Arg₃₄₀ Lys Glu Pro Ser Ile₃₄₅ Ile Val Leu Leu Leu₃₅₀ Thr Lys
 Gly Ala Arg₃₅₅ Ala Ser Glu Leu Thr₃₆₀ Ser Asp Gly Gln Ser₃₆₅ Ala Val Ser
 Ile Cys₃₇₀ Arg Arg Leu Thr Arg₃₇₅ Pro Lys Asp Tyr His₃₈₀ Ser Lys Thr Glu
 Gln Gly Gln Glu Ala Asn₃₉₀ Lys Asp Arg Ile Cys₃₉₅ Ile Asp Val Leu Glu₄₀₀
 Arg Glu Met Arg Arg₄₀₅ Asn Pro Met Ala Gly₄₁₀ Asp Ala Ser Ile Ser₄₁₅ Ser
 Gln Ile Met Pro₄₂₀ Asp Asp Leu His Met₄₂₅ Glu Leu Leu Asn Leu₄₃₀ Glu Asn
 Arg Val Ala₄₃₅ Leu Ala Arg Leu Phe₄₄₀ Phe Pro Ala Glu Ala₄₄₅ Lys Leu Ala
 Met Val₄₅₀ Ile Ala His Ala Glu₄₅₅ Thr Ser Glu Phe Ala₄₆₀ Ala Pro Ser Ser
 Ser Lys Gly Ser Ser Gly₄₇₀ Asn Leu Met Glu Val₄₇₅ Asp Leu Asn Glu Thr₄₈₀
 Pro Thr Val Gln₄₈₅ Asn Lys Arg Leu His Ser₄₉₀ Arg Leu Glu Ala Leu₄₉₅ Met
 Lys Thr Val Arg₅₀₀ Leu Gly Arg Cys Tyr₅₀₅ Phe Pro His Cys Ser₅₁₀ Glu Val
 Leu Asp Lys₅₁₅ Phe Ile Asp Asp Asp₅₂₀ Leu Pro His Leu Phe₅₂₅ Tyr Leu Glu
 Pro Gly Ser Ser Asp Glu Gln Lys Val Lys Arg Arg Arg Phe Met Glu

ES 2 627 863 A2

530

535

540

Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Ala Phe Asp Lys Asp Lys Ala Glu Cys
545 550 555 560

Asn Leu Ser Gly Leu Ser Ser Ser Ser Ser Thr Thr Ser Pro Glu Lys
565 570 575

Ile Gly Ala Asn Gln Lys Val Arg Glu Pro
580 585

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Citrus sinensis

<400> 21
tggctgtgac tatagtgatg ct 22

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Citrus sinensis

<400> 22
ccctaaccctt ctgatttgca cc 22

<210> 23
<211> 1906
<212> DNA
<213> Prunus domestica

<400> 23
tccaatgatt gctcccatta gctaatacaaa ttaatagtac attatagtat gataagattc 60
agcatatttct tcaaaactatc ctctcatctt tttttattat aatgtgtgta catagtaatt 120
aaaaacatta atccaaaacc caagttggat tacattaaac ccgtgaaccc aatgggctag 180
aattgtaggg tttcataggg aacaacaact gcaaagtcta aaaagtaaga gaaactctcg 240
tgaaacgggg atagcatttt ttggtctccg gggcagtaac aacatgatac ataggataac 300
ttttccgata catatgacaa cttctccaca tgtcatgttg ttattggccg gggatagcaa 360
aacagtgcata tccgcggtat aggtgagttt ttttcctaaa aagcggccaa aagtccgact 420
tctgaatcat caccacaacca gcaccttcgc cgattagacc catgcatgcc cctctttctc 480
tgcactttcc ctgaccgcca catattttatt ttttatttca caccttaatt ccatgaattt 540
ggtgccttca atgggaaaaa aaaaaaaaaa aaaaccagaa aatcccaatg gatTTTTTctt 600
gttgcccaag cccgacaaaa aaaggcaaat gcttgaatat caaggcttaa aattaaacag 660
cacaaaattg attaatcctc taatttcttt ccaaaaatcc tatcatatcc cattttcaat 720
ttgtgaattt acgaaattac ccctgttttt ttgatgactt cttcgggtctt cgggtaagga 780
aatgagactg ataaaatgga tataatagat ttccgaccac cctgctggat tttttttttg 840
ccactgccct tattatcgta cgctccaagt ttttttttta cttgcctatt ttggttcgcg 900

ES 2 627 863 A2

gttccacgct ataaagcgag ctacacccat ccaccaacca cctcacttct cttcttctcg 960
 tttccatagg ctttctctct ctctctgtgt tctttgtcta ggtacacctc attttctctt 1020
 cccattttta tttttccttg tggtcttggt cttcttggtg gggtatttct ttaggctata 1080
 tggctcttgc tctttttttc ttttggttca tctcccaaat cacatagatc aatgccttct 1140
 gaatgtaggg ttgagtttat ttgaggggtat atactctgtt tttgcttttc tgcaccagta 1200
 ttttgtgcyg atctctgttt ttaatttttt tccgtctgct tttgtttgtt gaaagtgaag 1260
 aagctgttta tctttttgac tggttggtct gtttcacttc aacaagcaac cagtagaaga 1320
 agtgtttttc tttatcttga tggctttttt cagcttctct tttggagaaa agattgattc 1380
 ttgtcaacat tcgccaaatg caccattttt attttcttc ttctttgata aaaagcgttt 1440
 tctctgcttt tgctaagcac ccttaattat taatattata agcctggatt tttatgatgg 1500
 gcttgaagct ttttatctgt ccgccactct gcaaatcctt tatgggtgca tctaattatt 1560
 acataattaa aacctggatc tttttttcat tattcttaac cactatctaa ggttgcattc 1620
 ttgttcaacc gcactgctct aattaacgtt tgtatgaggt gggttggtgga tgggtgtgtt 1680
 gggtttgaaa aactaaagaa attagtcttc tagaataata aataatatta ataataataa 1740
 tattattatt attgtaaagt cttcctgtta atgttggaat tattgacttg gtggtgatta 1800
 tccatctctt tttattgcga agcttctgga taccttgta tactcacggc ttgctttgta 1860
 cttgcagttt ttgaagggtc tctgatttac caatctgcta tcaatg 1906

<210> 24
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Primer

<400> 24
 ggcggatcca tgggtcctac tacttcatct cct 33

<210> 25
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Primer

<400> 25
 ggcgagctct caagcagcac cggtgccaac ctt 33

<210> 26
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Primer

<400> 26
 ggcggatcca tgagaaacgt attggtgaac aa 32

<210> 27
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Primer

 <400> 27
 ggcgagctct catttcctgt acgtaccagt aga 33

<210> 28
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Primer

 <400> 28
 ggcggatcca tgaggaacct actgacgaac 30

<210> 29
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Primer

 <400> 29
 ggcgagctct catcttctgt aggtaccagt aga 33

<210> 30
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Primer

 <400> 30
 ggcggatcca tgagcgtggc cactgtag 28

<210> 31
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Primer

 <400> 31
 ggcgagctct caagcagcag cagctgc 27

<210> 32
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Primer

<400> 32
ggatccgaat tcggcttcat atggctcc 28

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<400> 33
ccccgggatc gcacttctca aagaactcct 30

<210> 34
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<400> 34
cccgggagaa acgtattggt gaacaacga 29

<210> 35
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<400> 35
ggtacctttc cggtagtgac cagtagac 28

<210> 36
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<400> 36
ggtaccagga acctactgac caacggc 27

<210> 37
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<400> 37
gagctctcac cttctgtagg taccagtaga cc 32

<210> 38
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>			
<223>	Synthetic Primer		
<400>	38		
	cccgggatga gaaacgtatt ggtgaacaac g		31
<210>	39		
<211>	28		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Synthetic Primer		
<400>	39		
	ggtacctttc cggatatgtgc cagtagac		28
<210>	40		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Synthetic Primer		
<400>	40		
	ggtaccagga acctactgac caacggc		27
<210>	41		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Synthetic Primer		
<400>	41		
	gagctctcac cttctgtagg taccagtaga cc		32